

Phosphatakkumulation in diazotrophen, filamentösen Cyanobakterien der Ostsee

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Philipp Braun

geboren am 08.09.1987 in Berlin

Rostock, 22.10.2019

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio





Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

Gutachter:

Prof. Dr. Heide Schulz-Vogt

Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW)

Biologische Meereskunde

AG Geomikrobiologie

PD Dr. Stefan Forster

Universität Rostock

Institut für Biowissenschaften

AG Meeresbiologie

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2020

Für Franzi und Frieda
und
im Gedenken an
Prof. Dr. Frieder Schauer

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Zusammenfassung.....	1
Summary	2
Einleitung.....	3
Cyanobakterienblüten der Ostsee	3
Die Stickstofffixierung der Cyanobakterien	6
Die Bedeutung von Phosphor für Cyanobakterien	7
Phosphorhaltige Zellbestandteile	8
Zielstellung der Arbeit	11
Material und Methoden.....	12
Freilandexperimente.....	12
Laborexperimente.....	15
Manuelle Phosphatbestimmung.....	17
Bestimmung der Biomasse durch Zählung.....	18
Bestimmung von partikulärem organischem Kohlenstoff und Stickstoff	18
Bestimmung von Chlorophyll a und Phaeopigmenten	19
Bestimmung von Gesamtphosphor und gelöstem Phosphor	19
Quantifizierung von Polyphosphat.....	21
Quantifizierung von ATP.....	22
Quantifizierung von Lipiden	23
Stickstofffixierung	25
Polyphosphatlokalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie	25
NanoSIMS-Messungen	26
Rasterelektronenmikroskopie.....	27
Statistische Tests	27
Ergebnisse	28
Untersuchungen der Phosphataufnahme einer natürlichen Cyanobakteriengemeinschaft der Ostsee.....	28
Die Entwicklung der Phosphatkonzentration während der Freilandexperimente	28
Die Entwicklung der Biomasse gemessen am POC, PON und dem Chlorophyllgehalt	29
Die Änderungen der Phosphorfraktionen.....	32
Veränderungen der C:P und N:P Stöchiometrie	35
Veränderungen der phosphorreichen Zellkomponenten PolyP und ATP sowie der Lipidzusammensetzung.....	35

Die Stickstofffixierung in den Freilandexperimenten.....	41
Untersuchungen der Phosphataufnahme bei einer <i>N. spumigena</i> CY9414 Kultur.....	43
Die Entwicklung der Phosphatkonzentration während der Laborexperimente	43
Die Entwicklung der Biomasse gemessen am POC, PON und dem Chlorophyllgehalt	44
Die Änderungen der Phosphorfraktionen.....	46
Veränderungen der C:P und N:P Stöchiometrie	46
Veränderungen der phosphorreichen Zellkomponenten PolyP und ATP sowie der Lipidzusammensetzung.....	50
Die Stickstofffixierung in den Laborexperimenten	56
Zugabe von Methylphosphonat	56
Mikroskopische Untersuchungen der Phosphorakkumulation in unterschiedlichen Zelltypen von <i>Nodularia spumigena</i>	59
Licht- und Fluoreszenzmikroskopie, sowie NanoSIMS Messungen	59
Messungen des Phosphorgehalts am REM/EDX	59
Diskussion.....	63
Phosphataufnahme und Entwicklung der Biomasse in Abhängigkeit vom Ausgangszustand der Cyanobakterien.....	63
PolyP als intrazellulärer Phosphatspeicher	67
Änderungen in der ATP Konzentration	71
Lipidzusammensetzung der Cyanobakterien unter Phosphormangel.....	72
Phosphatspeicherung in Heterocysten und vegetativen Zellen	75
Die Stickstofffixierung der Cyanobakterien	78
Zusammenfassung und Ausblick	80
Literaturverzeichnis.....	82
Danksagung.....	94
Eidesstattliche Erklärung.....	96
Anhang	97
DNA Extraktion.....	97
Tabellen der C:N:P Stöchiometrie	98
Zusammenhang PolyP und ATP am Beispiel zweier Experimente	99
Prozentuale Zusammensetzung der Biomasse in den Freilandexperimenten.....	100
Lipidkonzentration in den Freilandexperimenten.....	101
Lipidkonzentration in den Laborexperimenten	103

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1) CYANOBAKTERIENBLÜTE IN DER ZENTRALEN OSTSEE	4
ABBILDUNG 2) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PHOSPHORKREISLAUFS UNTER BETEILIGUNG DER CYANOBAKTERIEN.....	10
ABBILDUNG 3) ÜBERBLICK ÜBER DIE ZUSAMMENSETZUNG DER EINZELNEN PHOSPHORFRAKTIONEN	10
ABBILDUNG 4) FAHRTROUTE UND STATIONEN DES FS „METEOR“	12
ABBILDUNG 5) DIE PROBENNAHME AN BORD DES FS „METEOR“	14
ABBILDUNG 6) EXPERIMENTELLER AUFBAU	15
ABBILDUNG 7) VERÄNDERUNG DER BIOMASSE ÜBER DIE ZEIT IN DEN FREILANDEXPERIMENTEN	30
ABBILDUNG 8) VERÄNDERUNG DER ZUSAMMENSETZUNG DER BIOMASSE ÜBER DIE ZEIT IN DEN FREILANDEXPERIMENTEN.....	31
ABBILDUNG 9) VERÄNDERUNG DER KONZENTRATIONEN DER PHOSPHORFRAKTIONEN ÜBER DIE ZEIT IN DEN FREILANDEXPERIMENTEN	33
ABBILDUNG 10) VERÄNDERUNG DER PHOSPHORFRAKTIONEN ÜBER DIE ZEIT IN DEN FREILANDEXPERIMENTEN	34
ABBILDUNG 11) VERÄNDERUNG DER C:P UND N:P STÖCHIOMETRIE ÜBER DIE ZEIT IN DEN FREILANDEXPERIMENTEN	36
ABBILDUNG 12) VERÄNDERUNG DER POLYP-KONZENTRATION ÜBER DIE ZEIT IN DEN FREILANDEXPERIMENTEN	37
ABBILDUNG 13) VERÄNDERUNG DER ATP KONZENTRATION ÜBER DIE ZEIT IN DEN FREILANDEXPERIMENTEN.	37
ABBILDUNG 14) VERÄNDERUNG DER LIPIDZUSAMMENSETZUNG ÜBER DIE ZEIT IN DEN FREILANDEXPERIMENTEN	39
ABBILDUNG 15) VERÄNDERUNG DER FETTSÄUREZUSAMMENSETZUNG DER PG- LIPIDKLASSE ÜBER DIE ZEIT IN DEN FREIEXPERIMENTEN.	40
ABBILDUNG 16) VERÄNDERUNG DES C:N VERHÄLTNISSES SOWIE VERLAUF DER STICKSTOFFFIXIERUNGSRATE UND TURNOVER-ZEIT FÜR STICKSTOFF ÜBER DIE ZEIT IN DEN FREILANDEXPERIMENTEN	42

ABBILDUNG 17) VERÄNDERUNG DER BIOMASSE ÜBER DIE ZEIT IN DEN LABOREXPERIMENTEN	45
ABBILDUNG 18) VERÄNDERUNG DER KONZENTRATIONEN DER PHOSPHOR- FRAKTIONEN ÜBER DIE ZEIT IN DEN LABOREXPERIMENTEN	47
ABBILDUNG 19) VERÄNDERUNG DER PHOSPHORFRAKTIONEN ÜBER DIE ZEIT IN DEN LABOREXPERIMENTEN	48
ABBILDUNG 20) VERÄNDERUNG DER C:P UND N:P STÖCHIOMETRIE ÜBER DIE ZEIT IN DEN LABOREXPERIMENTEN	49
ABBILDUNG 21) VERÄNDERUNG DER POLYP-KONZENTRATION ÜBER DIE ZEIT IN DEN LABOREXPERIMENTEN.	51
ABBILDUNG 22) VERÄNDERUNG DER ATP KONZENTRATION ÜBER DIE ZEIT IN DEN DREI LABOREXPERIMENTEN UND IN DER KONTROLLE	52
ABBILDUNG 23) VERÄNDERUNG DER LIPIDZUSAMMENSETZUNG ÜBER DIE ZEIT IN DEN LABOREXPERIMENTEN	54
ABBILDUNG 24) VERÄNDERUNG DER FETTSÄUREZUSAMMENSETZUNG DER PG- LIPIDKLASSE ÜBER DIE ZEIT IN DEN LABOREXPERIMENTEN	55
ABBILDUNG 25) VERÄNDERUNG DES C:N VERHÄLTNISSES SOWIE VERLAUF DER STICKSTOFFFIXIERUNGSRATE UND TURNOVER-ZEIT FÜR STICKSTOFF ÜBER DIE ZEIT IN DEN FREILANDEXPERIMENTEN	57
ABBILDUNG 26) ERGEBNISSE METHYLPHOSPHONAT-EXPERIMENTS	58
ABBILDUNG 27: MIKROSKOPISCHE BILDER VON N. SPUMIGENA FILAMENTEN, DIE MIT VERSCHIEDENEN MIKROSKOPISCHEN TECHNIKEN AUFGENOMMEN WURDEN..	60
ABBILDUNG 28: PHOSPHORAKKUMULATION IN VEGETATIVEN ZELLEN UND HETEROCYSTEN IN N. SPUMIGENA AUFGENOMMEN MIT DEM REM	62
ABBILDUNG 29) DARSTELLUNG DER PHOSPHATAUFNAHME NACH DEN ERKENNTNISSEN DIESER ARBEIT	79
ABBILDUNG 30) DARSTELLUNG DER BEDEUTUNG VON PHOSPHORMANGEL FÜR CYANOBAKTERIEN	79

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1) DIE HAUPTVERTRETER EINER BLÜTENBILDENEN CYANOBAKTERIENGEMEINSCHAFT DER ZENTRALEN OSTSEE	5
TABELLE 2) KOORDINATEN DER STATIONEN	13
TABELLE 3) ZUSAMMENSETZUNG METALLMIX	16
TABELLE 4) ZUSAMMENSETZUNG VITAMINMIXES	17
TABELLE 5) ZUSAMMENSETZUNG DER LUGOLSCHEN-LÖSUNG	18
TABELLE 6) ZUSAMMENSETZUNG DER OXIDATIONS-LÖSUNG	20
TABELLE 7) REAGENZIEN FÜR PHOSPHORBESTIMMUNG	20
TABELLE 8) ZUSAMMENSETZUNG DER MISCHREAGENZ FÜR PHOSPHORBESTIMMUNG. .	20
TABELLE 9) ZUSAMMENSETZUNG HEPES PUFFER	21
TABELLE 10) LÖSUNGEN FÜR DIE ATP QUANTIFIZIERUNG.	23
TABELLE 11) ZUSAMMENSETZUNG DES FLE-MIXES	23
TABELLE 12) DIE AUSGANGSKONZENTRATION VON PHOSPHAT AN DEN STATIONEN DER FREILANDEXPERIMENTE	28
TABELLE 13) DIE AUSGANGSKONZENTRATION VON PHOSPHAT IN DEN LABOREXPERIMENTEN	43
TABELLE 14) ANOVA ZUR ÜBERPRÜFUNG UNTERSCHIEDS IM PHOSPHORGEHALT VON VEGETATIVEN ZELLEN UND HETEROCYSTEN	61
TABELLE 15) T-TEST ZWISCHEN VEGETATIVEN ZELLEN UND HETEROCYSTEN ZU UNTERSCHIEDLICHEN ZEITEN	61

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
C	Kohlenstoff
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGDG	Digalaktosyldiacylglycerin
DIP	Gelöster anorganischer Phosphor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOP	Gelöster organischer Phosphor
DP	Gelöster Phosphor
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
MGDG	Monogalaktosyldiacylglycerin
N	Stickstoff
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NanoSIMS	Nano Sekundärionen-Massenspektrometer
P	Phosphor
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin/Lecithin
PE	Phosphatidyletanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Partikulärer anorganischer Phosphor
POC	Partikulärer organischer Kohlenstoff
PolyP	Polyphosphat
PON	Partikulärer organischer Stickstoff
POP	Partikulärer organischer Phosphor
PP	Partikulärer Phosphor
PS	Phosphatidylserin
Q-TOF	Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer
REM/SEM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
SQDG	Sulfoquinosyldiacylglycerin
TP	Gesamtphosphor

Zusammenfassung

Im Oberflächenwasser mariner Ökosysteme ist Phosphor ein limitierender Faktor für das Phytoplanktonwachstum, insbesondere für filamentöse, diazotrophe Cyanobakterien, da sie Stickstoff aus der Luft fixieren können und dadurch nicht von Stickstofflimitation betroffen sind. Die Arten *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon* sp. und *Dolichospermum* sp. kommen in der Ostsee vor, wo sie im Sommer große Blüten bilden. Wenn Phosphat vorhanden ist, nehmen die Cyanobakterien dieses auf und akkumulieren es intrazellulär. Diese Phosphorspeicher können unter Phosphormangel genutzt werden, um den Zellstoffwechsel und weiteres Wachstum für eine gewisse Zeit aufrecht zu erhalten. Der intrazelluläre Phosphorgehalt spiegelt sich z. B. im Kohlenstoff:Phosphor-Verhältnis wider. Bislang ist nicht bekannt, in welche Zellstrukturen Phosphor genau eingebaut wird. Daher wurde in dieser Studie der Gehalt phosphorreicher Zellstrukturen unter verschiedenen Phosphatbedingungen gemessen. Die Experimente wurden sowohl mit phosphorlimitierten natürlichen Cyanobakteriengemeinschaften der Ostsee als auch mit einer Laborkultur von *N. spumigena* CCY9414 durchgeführt. In verschiedenen Experimenten wurde phosphorverarmten Cyanobakterien Phosphat zugesetzt und 7 bis 15 Tage inkubiert. Zu definierten Zeiten wurden Proben genommen, um zelluläre Komponenten mit hohem Phosphorgehalt und elementaren Funktionen im Zellstoffwechsel zu messen. Die Analyse des Polyphosphatgehalts wurde sowohl mit einem quantitativen Ansatz als auch mit verschiedenen Mikroskopie-Techniken durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass Polyphosphate nur in vegetativen Zellen und nicht in Heterocysten gebildet wird. Die Ergebnisse der Freiland- und Laborexperimente zeigten, dass Phosphat im Wasser unmittelbar nach der Zugabe abnimmt, während die Menge an Polyphosphat steigt und ATP abnimmt. Nach einigen Tagen wurden ein Rückgang der Menge an Polyphosphaten und ein Anstieg von ATP beobachtet, während Phosphat im Wasser aufgebraucht war. Die Stickstofffixierung stieg, nachdem ATP wieder gebildet wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass Cyanobakterien Phosphor zunächst als Polyphosphate speichern. Von dort wird er auf andere Zellstrukturen wie ADP übertragen, um Stoffwechselprozesse zu unterstützen. Diese Informationen sind ein wesentlicher Schritt zum Verständnis der Phosphordynamik von Cyanobakterien und zeigen des Weiteren, dass eine Aufgabenteilung zwischen vegetativen Zellen und Heterocysten nicht auf die Stickstofffixierung beschränkt ist.

Summary

In surface waters of marine ecosystems, phosphorus is a limiting factor for phytoplankton growth, especially for filamentous, diazotrophic cyanobacteria, as these are able to fix nitrogen from the air and therefore are not affected by nitrogen limitation. The cyanobacterial species *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon* sp. and *Dolichospermum* sp. occur in the Baltic Sea, where they form large blooms during the summer months. If phosphate is present, the cyanobacteria take it up and accumulate it intracellularly, thus ensuring the growth of cyanobacteria under phosphorus-depleted conditions for a certain period of time. These phosphorus storages can be used under phosphorus deficiency conditions to maintain cell metabolism. This is reflected, for example, in the carbon:phosphorus ratio. It is not yet known in which cell structures phosphorus is incorporated or used. To address this question, the amount of phosphorus-rich cell structures under different phosphate concentrations was measured in this study. The experiments were performed with a phosphorus-limited natural cyanobacterial community from the Baltic Sea, as well as with a laboratory culture of *Nodularia spumigena* CCY9414. Phosphate was added to phosphorus-depleted cyanobacteria in various experiments and incubated for 7 to 15 days. At defined times samples were taken to measure cellular components with high phosphorus content and elementary functions in cell metabolism such as polyphosphates, phospholipids and ATP, as well as nitrogen fixation rate, cell stoichiometry, biomass and chlorophyll a content. The analysis of the polyphosphate content was performed with a quantitative approach as well as with different microscopy techniques such as SEM and NanoSIMS. The results showed that phosphate in water decreases immediately after addition, while the amount of polyphosphate increases and ATP decreases. After a few days, a decrease in the amount of polyphosphates and an increase in ATP were observed, while phosphate in the water was depleted. Nitrogen fixation increased after ATP was formed again. These results show that cyanobacteria initially store phosphorus as polyphosphates. From there it is transferred to other cell structures such as ADP to support metabolic processes. This information is an essential step in understanding the phosphorus dynamics of cyanobacteria and further shows that task sharing between vegetative cells and heterocysts is not limited to nitrogen fixation.

Einleitung

Cyanobakterienblüten der Ostsee

In den warmen Sommermonaten treten bei Wassertemperaturen über 16 °C, hoher Sonneneinstrahlung und windstillen Bedingungen regelmäßig große Oberflächenansammlungen von filamentösen, diazotrophen Cyanobakterien in der zentralen Ostsee auf (HELCOM, 1988; Sivonen *et al.*, 1989; Finni *et al.*, 2001; Vahtera *et al.*, 2005; Kahru *et al.*, 2007; Abbildung 1). Diese sogenannten Cyanobakterienblüten bestehen hauptsächlich aus einer Gemeinschaft der Arten *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon* sp. und *Dolichospermum* sp. (Kononen *et al.*, 1996; Wasmund, 1997; Tabelle 1). Diese Cyanobakterienblüten wirken sich auf die Wasserqualität der Ostsee aus und nehmen Einfluss auf die biogeochemischen Prozesse sowie die Nährstoffzyklen dieses Ökosystems. Durch die Sedimentation und den Abbau abgestorbener Cyanobakterien in den tiefen Ostseebecken wird beispielsweise der Sauerstoffverbrauch beschleunigt, was wiederum zur Bildung von anoxischen Bereichen führt (Struck *et al.*, 2004). Des Weiteren beeinflussen sie die Nutzbarkeit der Ostsee für den Tourismus und die Fischerei, da einige Cyanobakterienarten starke Toxine bilden können (Sivonen *et al.*, 1989; Vahtera *et al.*, 2007b; Gehringer und Wannicke, 2014). Diese Toxine sammeln sich in der Nahrungskette an und können für Fische, Vögel und Säugetiere tödlich sein. Die steigenden Blütenfrequenzen und die Expansion der Blüten in den letzten Jahrzehnten werden auf die Phosphoreinträge in die Ostsee zurückgeführt. Zusätzlich wird in den letzten Jahren diskutiert, ob man in die Blütenbildung der Cyanobakterien eingreifen und diese reduzieren muss (Zillé und Conley, 2010), oder ob sie ein natürliches Charakteristikum der Ostsee darstellen (Bianchi *et al.*, 2000). Paläo-Ozeanografische Untersuchungen haben gezeigt, dass es bereits vor mehr als 7000 Jahren zu solchen Blüten in der Ostsee kam (Bianchi *et al.*, 2000; Poutanen und Nikkilä, 2001; Funkey *et al.*, 2014).



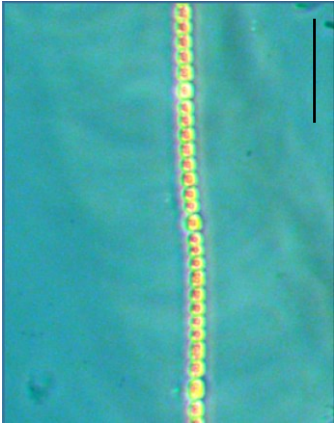
Cyanobakterien betreiben, wie auch eukaryotische, phototrophe Organismen, eine oxygene Photosynthese. Bei dieser Art der Photosynthese dient ausschließlich Wasser als Reduktionsmittel für Kohlenstoffdioxid. Elementarer, molekularer Sauerstoff wird dabei als Oxidationsprodukt des Wassers freigesetzt. Die Photosynthese der Cyanobakterien findet in den Thylakoidmembranen statt. Dabei können Cyanobakterien, anders als Pflanzen, ein

breites Lichtspektrum für die Photosynthese nutzen. Das wird ermöglicht durch Phycobilisome, einem speziellem Proteinkomplex, in dem Phycocyanin (blau) und Phycoerythrin (rot) vorkommt, wodurch auch das Licht von ca. 500 – 600 nm genutzt werden kann. Einige Cyanobakterien betreiben des Weiteren eine anoxygene Photosynthese, bei der Schwefelwasserstoff als Reduktionmittel genutzt wird, wodurch kein Sauerstoff, sondern elementarer Schwefel gebildet wird (Cohen *et al.*, 1975; Zehr *et al.*, 2008).



Abbildung 1) Cyanobakterienblüte in der zentralen Ostsee. A) Satellitenaufnahme mit dem NASA-MODIS Rapid Response System am 22.07.2014. Die Cyanobakterienblüte ist durch das Chlorophyll zu erkennen. B) Cyanobakterienblüte aufgenommen im August 2015 auf der Ausfahrt des FS „Meteor“ (Foto: P. Braun).

Tabelle 1) Überblick über die Hauptvertreter einer blütenbildenden Cyanobakteriengemeinschaft (Oxyphotobacteria) in der zentralen Ostsee. Alle Arten gehören zur Ordnung Nostocales. Maßstabsbalken in den Bildern: N. spumigena 10 µm; Aphanizomenon sp. 100 µm; Dolichospermum sp. 1 µm (Foto: P. Braun)

	<i>Nodularia spumigena</i> (Mertens ex Bornet und Flahault, 1886)	<i>Aphanizomenon</i> sp. (Ralf ex Bornet und Flahault, 1886)	<i>Dolichospermum</i> sp. (Ralfs, ex Bornet und Flahault, 1886)
Filamentlänge	bis 2 cm	bis 5 mm	bis 10 µm
Zellzahl je Filament	> 100	20 - 50	> 50
Gasvakuole	Ja	Ja	Ja
Heterocysten pro Filament	Ja, mehrere	Ja, eine	Ja, mehrere
Toxin	Ja; Nodularin (Hepatotoxin)	zum Teil; Microcystin (Hepatotoxin)	zum Teil; Anatoxin A (Neurotoxin) und Microcystin (Hepatotoxin)
Genomgröße	ca. 5,5 mbp (5.363 Gene)	noch nicht bekannt	noch nicht bekannt
Sonstiges		Clusterbildung	früher bekannt als <i>Anabaena</i> sp. (Wacklin et al., 2009)
			

Die Stickstofffixierung der Cyanobakterien

Die Bezeichnung „diazotroph“ drückt bereits aus, dass die filamentösen Cyanobakterien der Ostsee in der Lage sind Luftstickstoff (N_2) zu fixieren. Damit haben sie den Vorteil gegenüber anderen Phytoplanktern, dass sie unter stickstofflimitierten Bedingungen, die regelmäßig nach der Frühjahrsblüte auftreten, wachsen können und die autotrophe Planktongemeinschaft dominieren (Vahtera *et al.*, 2007a). Durch diese Fähigkeit sorgen die Cyanobakterien für einen Stickstoffeintrag von 100.000 - 370.000 t pro Jahr (Melvasalo *et al.*, 1983; Elmgren und Larsson, 2001; Wasmund *et al.*, 2001, 2005) in der Ostsee. Dies entspricht ca. 1/3 des jährlichen Stickstoffeintrags (HELCOM, 1997, 1998; Voss *et al.*, 2005), wodurch wiederum die Eutrophierung gefördert wird. Andererseits sorgen sie so auch dafür, dass die Nahrungsnetze aufrecht erhalten bleiben. In zahlreichen Studien wurde die Stickstofffixierungsleistung von Cyanobakterien untersucht (z. B.: Hübel und Hübel, 1980; Leppänen *et al.*, 1988; Stal *et al.*, 1999; Ohlendieck *et al.*, 2000; Stal und Walsby, 2000; Wasmund *et al.*, 2001; Vahtera *et al.*, 2007a; Ploug *et al.*, 2011; Wannicke *et al.*, 2012, 2013; Kolzau *et al.*, 2018). Die Stickstofffixierung findet bei diazotrophen Cyanobakterien in hochspezialisierten Zellen statt, den Heterocysten. In Zeiten des Stickstoffmangels können sie sich aus den vegetativen Zellen entwickeln. Die Umwandlung von vegetativen Zellen zu Heterocysten wird vor allem durch die Regulatoren NtcA und HetR gesteuert (Adams, 2000; Muro-Pastor *et al.*, 2002). Bei dieser Umwandlung kommt es zur Ausbildung von einer verdickten, mehrschichtigen und spezifischen Glykolipidschicht (engl. „Heterocyst-specific glycolipids“ = Hgls) und einer Hüll-Polysaccharidschicht (Nicolaisen *et al.*, 2009). Die Stickstofffixierung wird durch das Enzym Nitrogenase katalysiert, welches nur in den Heterocysten vorkommt, da es in den vegetativen Zellen durch Sauerstoff und Ammonium (Huber, 1986) gehemmt wird. In den Heterocysten finden keine Photosynthese und damit verbundene CO_2 -Fixierung und O_2 -Produktion statt (Wolk *et al.*, 1994; Bergman *et al.*, 1997). Heterocysten sind in bestimmten Cyanobakterien (z. B. *Nodularia* sp., *Aphanizomenon* sp. und *Dolichospermum* sp.) in regelmäßigen Abständen zwischen den vegetativen Zellen des Filaments verteilt. Die vegetativen Zellen stellen den Heterocysten Kohlenstoff bereit und erhalten im Austausch dafür Stickstoff (Wolk, 1968; Wolk *et al.*, 1974, 1994; Wolk und Shaffer, 1976). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass Maltose am interzellulären Transfer von Kohlenstoff beteiligt ist (Curatti *et al.*, 2002;

Cumino *et al.*, 2007) und das Glutamat und Glutamin zwischen den Zellen ausgetauscht wird (Wolk und Shaffer, 1976; Thomas *et al.*, 1977; Martín-Figueroa *et al.*, 2000).

Die Bedeutung von Phosphor für Cyanobakterien

Phosphor ist eines der lebenswichtigsten Nährstoffe für pflanzliche und tierische Zellen. Es gibt kaum einen Stoffwechselprozess, bei dem Phosphor nicht in irgendeiner Form beteiligt ist (Kuhl, 1960; Karl, 2000). Im Meer ist Phosphor oft in sehr geringen Konzentrationen vorhanden und kann neben Stickstoff das Wachstum des Phytoplanktons limitieren. Da diazotrophe Cyanobakterien Luftstickstoff fixieren können (siehe oben), ist ihre Entwicklung hauptsächlich vom Phosphor abhängig (Nausch und Nausch, 2004; Nausch *et al.*, 2008, 2009, 2012). Phosphor beeinflusst das Wachstum, die Stickstoff- und Kohlenstofffixierung sowie die photosynthetische Aktivität (Stal *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2004; Moutin *et al.*, 2008). Phosphor ist der wesentlichste Faktor, der die Blütenbildung reguliert. Die Phosphorregulation steht dabei in Wechselwirkung mit anderen Umweltfaktoren wie Änderungen in der Lichtintensität (Roleda *et al.*, 2008), Temperatur und Windintensität (Wasmund, 1997), sowie Eisen- und Sulfat-Konzentration des Wassers (Stal *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2004). Phosphorquellen sind gelöstes organisches und anorganisches Phosphat (DOP, DIP; Unger *et al.*, 2013; Abbildung 3). Dabei haben die einzelnen Cyanobakterienarten unterschiedliche Präferenzen, welche Art von Phosphor aufgenommen wird (Degerholm *et al.*, 2006). *N. spumigena* bevorzugt anorganisches Phosphat (Laanemets *et al.*, 2006; Svedén *et al.*, 2015; Schoffelen *et al.*, 2018), kann aber nach anderen Studien auch organisches Phosphat benutzen (Vahtera *et al.*, 2007b). *Aphanizomenon* sp. präferiert organisches Phosphat (Klawonn *et al.*, 2015; Schoffelen *et al.*, 2018) und *Dolichospermum* sp. nutzte in Experimenten beide Arten von Phosphat (Schoffelen *et al.*, 2018).

Viele Studien setzen sich mit den Nährstoffbedingungen auseinander, die das Wachstum und die Entwicklung der Cyanobakterien beeinflussen (zum Beispiel: Niemi, 1979; Smith, 1984; Sivonen *et al.*, 1989; Grönlund *et al.*, 1996; Pollingher *et al.*, 1998; Levine und Schindler, 1999; Berman, 2001). Als Grundvoraussetzung für die Entwicklung der Cyanobakterien wird ein niedriges N:P-Verhältnis an gelösten anorganischen Nährstoffen im Wasser beschrieben (Perakis *et al.*, 1996; Yusoff und McNabb, 1997; Holz und Hoagland, 1999; Rydin *et al.*, 2002; Wasmund *et al.*, 2005; Schindler, 2014). Diese Voraussetzung

kommt im Winter im Oberflächenwasser der Ostsee vor und resultiert im Frühjahr nach der Frühlingsblüte in einem Phosphorüberschuss. Dies schafft die Voraussetzungen für das Wachstum stickstofffixierender Cyanobakterien (Niemi, 1979; Smith, 1984; Grönlund *et al.*, 1996; Pollinger *et al.*, 1998; Levine und Schindler, 1999; Berman, 2001; Finni *et al.*, 2001; Janssen *et al.*, 2004). Die Blütenbildung findet jedoch in einem Zeitraum statt, in dem Phosphat im Oberflächenwasser weitestgehend aufgebraucht ist (Nausch *et al.*, 2008), was zu einem reduzierten zellulären Phosphorgehalt führt (Feijoó *et al.*, 2008). Dennoch können die Cyanobakterien unter Phosphormangelbedingungen im Wasser wachsen (Degerholm *et al.*, 2006). Die Cyanobakterien müssen demnach an neue Phosphorquellen gelangen. Auftriebs-Ereignisse, bei denen mit gelöstem Phosphat angereichertes, aber stickstoffarmes Tiefenwasser in die oberen Wasserschichten gelangt, konnten als eine solche Quelle identifiziert werden (Nausch *et al.*, 2009). Durch diesen Eintrag können zelluläre Phosphorspeicher aufgefüllt werden, auf die die Cyanobakterien unter Phosphormangelsituationen zurückgreifen (Nausch *et al.*, 2009). Trotz vieler Untersuchungen ist bislang unklar wie filamentöse, diazotrophe Cyanobakterien Phosphormangel kompensieren. Gegenwärtige Kenntnisse beruhen hauptsächlich auf Untersuchungen der C:N:P Stöchiometrie und anderer Parameter wie z. B. der alkalischen Phosphatase Aktivität (Paasche und Erga, 1988; Granéli *et al.*, 1990; Kononen *et al.*, 1993). Diese Studien zeigten, dass die Cyanobakterien eine hohe Plastizität in ihrem intrazellulären Phosphorgehalt aufweisen (Geider und La Roche, 2002; Walve und Larsson, 2007; Reinfelder, 2012). In Gegenwart von Phosphat konnten C:P Werte von 30 - 50:1 und unter Phosphormangel von > 400:1 gemessen werden (Walve und Larsson, 2007, 2010; Nausch *et al.*, 2009). Diese stöchiometrischen Bestimmungen geben Aufschluss über den intrazellulären Phosphorstatus der Cyanobakterien, lassen jedoch keine Aussage darüber zu, wie die Veränderung des zellulären Phosphorgehalts funktioniert und welche intrazellulären Strukturen an diesen Prozessen beteiligt und von einer möglichen Änderung betroffen sind.

Phosphorhaltige Zellbestandteile

Intrazelluläre Bestandteile, die grundlegende Bedeutungen für das Wachstum und den Metabolismus besitzen und zudem einen hohen Gehalt an Phosphat aufweisen, sind Polyphosphat (PolyP), Adenosintriphosphat (ATP), Phospholipide, Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA; Karl und Björkman, 2002). Da sie zum zellulären

Phosphorgehalt beitragen, kann davon ausgegangen werden, dass ihr Gehalt bei Phosphatmangel abnimmt, mit negativen Auswirkungen für den Zellmetabolismus (Grossman und Takahashi, 2001). Die Auswirkungen von Phosphormangel auf phosphorreiche Zellstrukturen wurden insbesondere bei Grünalgen untersucht (Kanai und Simonis, 1968; Aitchison und Butt, 1973; Piorreck und Pohl, 1984; Eixler *et al.*, 2006), jedoch fehlen solche Studien an Cyanobakterien.

PolyP gilt als anorganischer Phosphorspeicher und wurde in den unterschiedlichsten Mikroorganismen nachgewiesen (u. a. Brock und Schulz-Vogt, 2011; Breus *et al.*, 2012; Langer *et al.*, 2018; Schulz-Vogt *et al.*, 2019). Die Bildung von PolyP ist abhängig von der Phosphatverfügbarkeit und wird durch die Polyphosphatkinase vermittelte Dephosphorylierung von ATP zu ADP gebildet (Kromkamp, 1987). Die Bildung von PolyP ist besonders intensiv, wenn Organismen vor einer Phosphatzugabe einem Phosphormangel ausgesetzt waren. (Aitchison und Butt, 1973; Bhaya *et al.*, 2000). In Studien am Cyanobakterium *Trichodesmium* sp. konnte gezeigt werden, dass 8 - 25 % des gesamten zellulären Phosphor pools in Form von PolyP vorliegt (Orchard *et al.*, 2010). Studien an *Anabaena circinalis* zeigen, dass Phosphat aus PolyP für die Bildung von Akineten benutzt wird und das Akineten nach der Differenzierung kein PolyP enthalten (van Dok und Hart, 1996), dagegen konnte eine Anreicherung von Nukleinsäure beobachtet werden (Sukenik *et al.*, 2012). In den letzten Jahren wurden von Diaz und Ingall (2010), sowie Martin und Van Mooy (2013) neue Methoden etabliert, die quantitative Aussagen über den PolyP-Gehalt von Proben und darin befindlichen Bakterien zulassen.

ATP ist der Energieträger, der zelluläre Stoffwechselprozesse katalysiert. ATP vermittelt den Transfer von Energie und wird oft als Indikator für den energetischen Zustand von Zellen benutzt. Der ATP-Gehalt wurde zur Bestimmung lebender mikrobieller Biomasse herangezogen (Holm-Hansen und Booth, 1966; Hodson *et al.*, 1976; Chida *et al.*, 2012), da bei der Neubildung von Biomasse neues ATP produziert wird, um das für die Zellfunktionen notwendige Niveau zu halten. Zusätzlich spielt ATP bei der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von PolyP eine entscheidende Rolle (Kromkamp, 1987). Theodorou *et al.* (1991) und Said (2009) untersuchten den zellulären ATP-Gehalt im Hinblick auf die Phosphorverfügbarkeit und konnten rausfinden, dass der Gehalt ATP, ADP und AMP unter Phosphormangelbedingungen sinkt.

Phospholipide sind zusammen mit Glykolipiden Bestandteil von pflanzlichen und tierischen Organismen sowie von Bakterien. Dabei ist der Anteil, den Phospholipide am Gesamtphosphorgehalt von Zellen ausmachen, abhängig vom jeweiligen Organismus (Vadstein, 1998; Makino *et al.*, 2003; Cotner *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu heterotrophen Bakterien besitzen Cyanobakterien nur eine Gruppe von Phospholipiden, das Phosphatidylglycerol (PG) (Boudière *et al.*, 2014). Unter Phosphormangel können Cyanobakterien Phospholipide durch schwefel- und stickstoffhaltige Lipide ersetzen (Van Mooy *et al.*, 2008) und sind somit zu einem gewissen Grad von der Phosphorlimitation unabhängig.

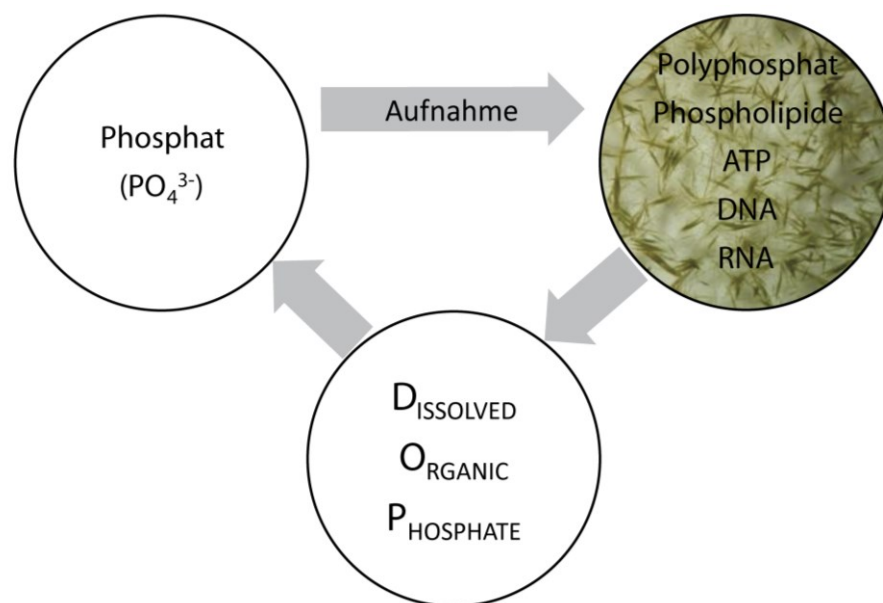


Abbildung 2) Schematische Darstellung des Phosphorkreislaufs unter Beteiligung der Cyanobakterien. Gelöstes anorganisches Phosphat wird von den Cyanobakterien aufgenommen und in Form von PolyP, Phospholipide, ATP, DNA und RNA gespeichert. Wenn die Bakterien absterben, wird gelöste organische Phosphor (DOP) frei und kann wieder von anderen Organismen in anorganisches Phosphat überführt werden.

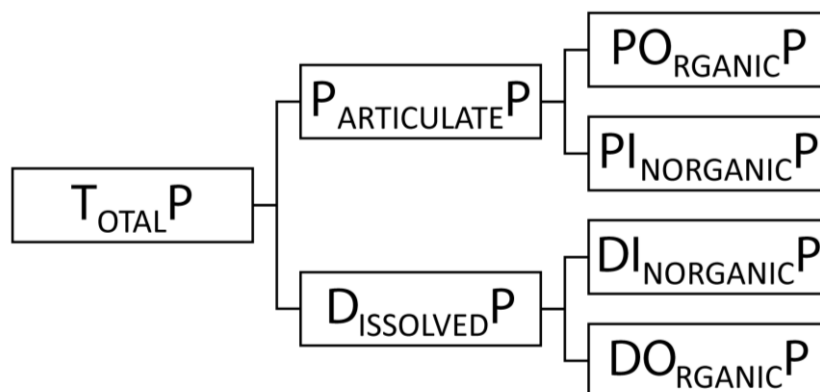


Abbildung 3) Überblick über die Zusammensetzung der einzelnen Phosphorfractionen. Partikulärer organischer Phosphor (POP) und partikulärer anorganischer Phosphor (PIP) bilden partikulären Phosphor (PP). Gelöster organischer Phosphor (DOP) und gelöster anorganischer Phosphor (DIP) bilden gelösten Phosphor (DP). PP und DP bilden zusammen den Gesamtphosphor (TP).

Zielstellung der Arbeit

Das Ziel dieser Studie war, die Phosphataufnahme von Cyanobakterien bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen im Wasser zu untersuchen und die damit verbundene Änderung der C:N:P Stöchiometrie. Eine Frage dabei war, in welche Zellstrukturen Phosphor eingebaut wird und welche an der Regulation von Wachstum und Stickstofffixierung beteiligt sind. Dabei wurde der Fokus auf die phosphorreichen Zellkomponenten PolyP, ATP und Phospholipide gelegt. Diese Zellkomponenten besitzen grundlegende Funktionen im Zellmetabolismus und können die Zellstöchiometrie maßgeblich beeinflussen. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob und wie alle diese Zellverbindungen an der Regulierung des intrazellulären Phosphorgehalts beteiligt sind. Mit diesen Untersuchungen soll das Verständnis erweitert werden, wie die Phosphatverfügbarkeit Einfluss auf die intrazellulären Phosphor pools und auf die Phosphorregulation und Physiologie der Cyanobakterien nimmt. Diese Erkenntnisse können künftig für biogeochemische Modelle benutzt werden, um die Prognosen über die Blütenbildung der Cyanobakterien unter sich ändernden Umweltbedingungen besser einzuschätzen zu können und um Maßnahmen abzuwägen, welche das Ökosystem der Ostsee in einem guten ökologischen Zustand halten.

Im Speziellen sollten in dieser Arbeit Antworten auf die Frage gefunden werden, ob und wie sich die intrazellulären Phosphorspeicher als eine Reaktion auf die extrazelluläre Phosphatverfügbarkeit auswirken und ob sich die Menge an interzellulären Polyphosphaten ändern? Der Gehalt an ATP wurde als ein Indikator für die Zellaktivität untersucht. Es wurde untersucht, ob und wie sich die Stickstofffixierung bei sich ändernden Phosphatbedingungen verhält. Diese Experimente sollten auch zeigen, ob diese Fixierungsrate in Zusammenhang mit den von uns untersuchten Zellstrukturen steht. Alle Untersuchungen wurden als Batch-Kultur-Experimente durchgeführt, in denen die Nährstoffgradienten, Biomasse und die C:N:P Stöchiometrie durch das Wachstum der Cyanobakterien selbst erzeugt wurden. Somit sollte gewährleistet werden, dass alle Prozesse so ablaufen, wie sie auch im natürlichen Ökosystem ablaufen würden. Die in den Experimenten eingesetzten Phosphorkonzentrationen wurden so gewählt, dass sie den Natürlichen entsprechen. Die Untersuchungen wurden sowohl mit einer natürlichen Cyanobakteriengemeinschaft, als auch mit einer Laborkultur von *N. spumigena* CCY9414 durchgeführt.

Material und Methoden

Freilandexperimente

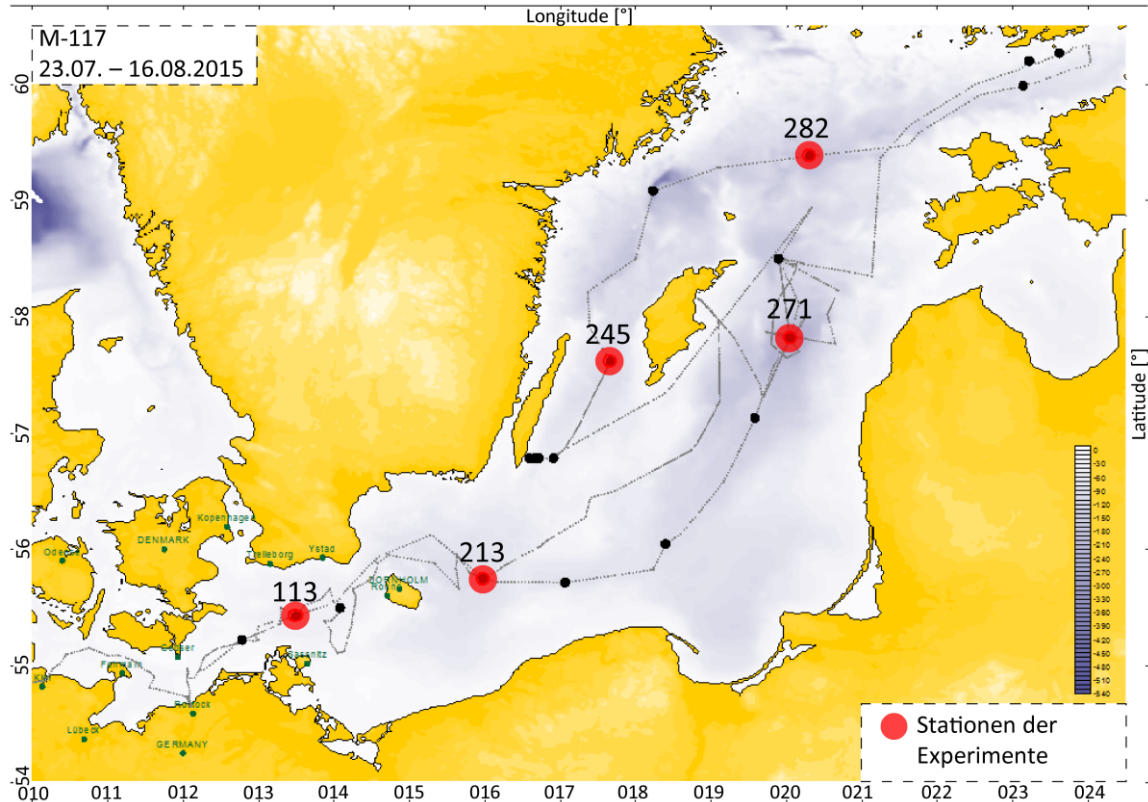


Abbildung 4) Fahrtroute und Stationen (schwarze Punkte) des FS „Meteor“ vom 23.07. - 16.08.2015 in der Ostsee. Schwarze Punkte zeigen alle Stationen der Ausfahrt, rote Punkte zeigen die Stationen der Probenahme.

Während der Ausfahrt M-117 mit dem FS „Meteor“ im Juli - August 2015 wurden insgesamt fünf Experimente mit einer natürlichen Cyanobakteriengemeinschaft durchgeführt. An fünf Stationen (Abbildung 4, Tabelle 2) wurden diese mit einem Planktonnetz (Maschenweite 55 μm) aus der oberen durchmischten Schicht (0 m bis zu der Thermokline bei ca. 10 m Tiefe) gesammelt (Abbildung 5 A) und an Deck in einen Scheidetrichter überführt. Der Scheidetrichter wurde bis zum Rand aufgefüllt und verschlossen. Die obere Hälfte des Trichters wurde mit einer schwarzen Kappe abgedunkelt und für 15 min an Deck stehen gelassen. In dieser Zeit sammelten sich die Cyanobakterien aufgrund ihrer Gasvakuolen im oberen Bereich des Trichters, während schwerere Diatomeen nach unten sanken und das Zooplankton aktiv zum Licht abwärts schwamm (Abbildung 5 C). Diatomeen und Zooplankton wurde mittels eines Ablassshahns entfernt, der Scheidetrichter mit filtriertem Wasser der jeweiligen Station erneut aufgefüllt und stehen gelassen. Dieser Vorgang wurde

insgesamt dreimal durchgeführt, so dass sich am Ende eine aufgereinigte Gemeinschaft filamentöser Cyanobakterien im Scheidetrichter befand. Diese wurde für die Experimente genutzt (Abbildung 5 D).

Ein Experiment umfasste drei Polycarbonatflaschen (= 3 Parallelen). Diese wurden mit 23,5 L zweifach filtriertem Wasser (3 μm und anschließend durch 0,2 μm Filter) der jeweiligen Station befüllt. Der Deckel hatte zwei Durchlässe. Über einen wurde Luft, welche von Aquariumpumpen produziert wurde, durch gasdichte Schläuche über 0,2 μm Sterilfilter in die Flaschen geleitet. Direkt unter dem Deckel waren die Schläuche mit einem vorher sterilisierten Glasrohr verbunden, dass die Luft bis zum Boden der Flasche leitete. Dort sprudelte die Luft durch einen Keramikstein, so dass neben der Versorgung mit CO_2 auch eine gewisse Wasserbewegung gewährleistet war. Der Druckausgleich erfolgte über den zweiten Durchlass im Deckel, der mit einem 0,2 μm Filter verschlossen war, um Kontaminationen zu vermeiden. Am Boden der Flaschen befanden sich Auslasshähne, über die beim jeweiligen Zeitpunkt die Proben entnommen wurden, sodass man die Flaschen nicht öffnen musste (Abbildung 6 A und C). Durch Berieselung der Flaschen mit Seewasser sollten *in situ*-nahe Temperaturbedingungen aufrechterhalten werden. Zusätzlich wurde ein Netz über die Flaschen gelegt, um die Intensität der Sonnenstrahlung zu vermindern. Zu Beginn eines jeden Experiments wurde in jede der drei Parallelen eine definierte Menge der aufgereinigten Cyanobakteriengemeinschaft gegeben. Anschließend wurde Phosphat in verschiedenen Endkonzentration (Tabelle 12) zugesetzt. Die Cyanobakterien wurden sieben Tage lang inkubiert, wobei eine Beprobung unmittelbar nach der Zugabe von Phosphat (t_0) und 3, 24, 72, 120 und 168 h nach der Zugabe stattfand.

Tabelle 2) Koordinaten der Stationen, an denen die Experimente durchgeführt wurden.

Station	Latitude	Longitude
113	N 54° 55.500	E 013° 30.000
213	N 55° 15.000	E 015° 59.000
245	N 57° 07.000	E 017° 40.000
271	N 57° 19.200	E 020° 03.000
282	N 58° 53.000	E 020° 19.000

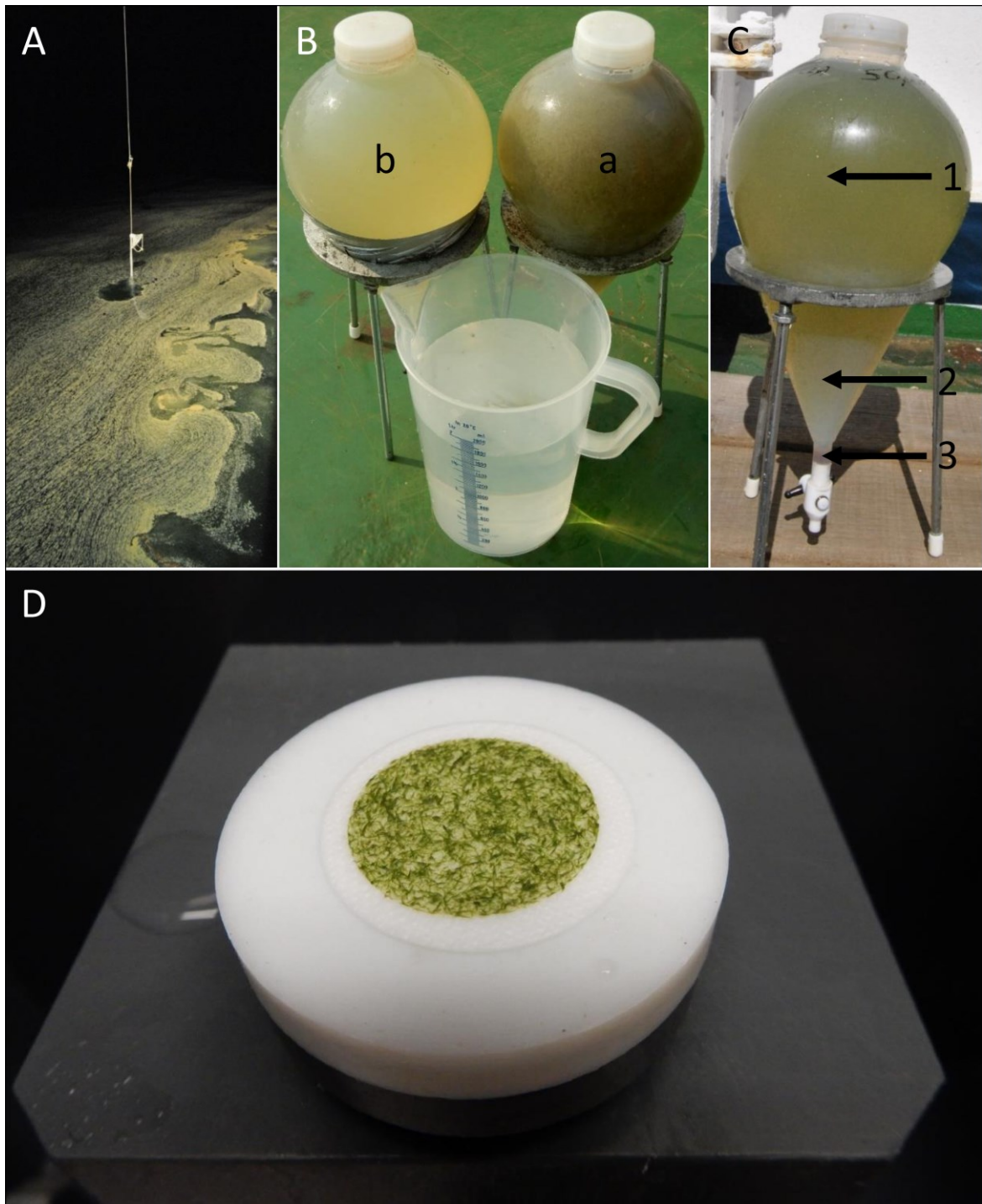


Abbildung 5) Die Probennahme an Bord des FS „Meteor“. A) Planktonnetz in der Cyanobakterienblüte. B) Scheidetrichter gefüllt mit einer Suspension von Cyanobakterien (a) und einer verdünnten Suspension (b). C) Schichtung im Scheidetrichter: Cyanobakterien (1), Schicht mit Zooplankton (2) und Diatomeen (3). D) Aufgereinigte Cyanobakteriengemeinschaft auf einem GF/F Filter.

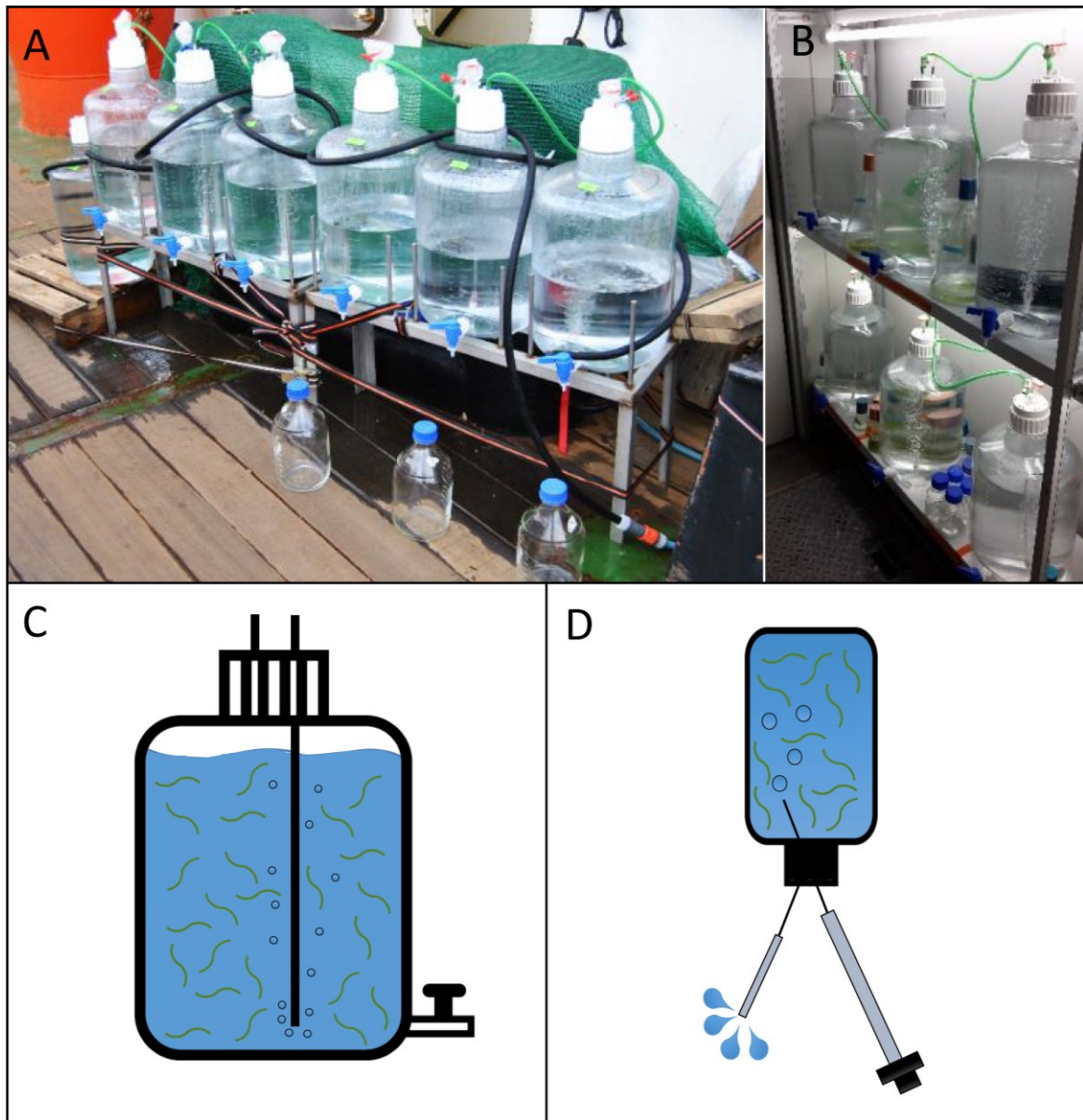


Abbildung 6) Experimenteller Aufbau. A) Experimente mit einer natürlichen Cyanobakteriengemeinschaft an Deck des FS „Meteor“. B) Laborexperimente mit einer *Nodularia spumigena* CY9414 Kultur. C) Schematischer Aufbau einer Experimentierflasche. D) Schematischer Aufbau der Stickstofffixierungsexperimente.

Laborexperimente

Die Laborexperimente unter Verwendung einer *Nodularia spumigena* CCY9414 Kultur fanden von August bis September 2016 statt. Der Aufbau glich dem der Freiland Experimente (Abbildung 6 B und C), wurde aber in einem klimatisierten Raum bei 15 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h durchgeführt. Für die Experimente wurde gealtertes Seewasser verwendet, welches auf einer Ausfahrt mit der „Rosenort“ vor die Darßer Küste (N 54° 23.216 E 012 ° 13.293) aus 12 m Tiefe entnommen wurde. Das Wasser wurde in einen 1000 L Tank gefüllt und für eine Woche im Lager des IOWs in Marienehe bei natürlicher Umgebungstemperatur und Tag-Nacht-Rhythmus stehen gelassen, so dass alle

autotrophen Prozesse normal ablaufen konnten. Damit sollte erreicht werden, dass das Phosphat, welches im Wasser vorhanden war, aufgebraucht werden konnte. Als keine Veränderung im Phosphatwert mehr zu erkennen war ($< 1,0 \mu\text{mol/L}$), wurde das Wasser in einen neuen 1000 L Tank mittels einer Filtrationsanlage überführt. Der Tank wurde daraufhin abgedunkelt und so verschlossen, dass noch ein Sauerstoffaustausch mit der Luft stattfinden konnte. Das Wasser in dem Tank wurde so für drei Monate gelagert, wodurch sich ein stabiles biogeochemisches Gleichgewicht der Nährstoffe einstellen konnte. Vor dem Start der Experimente wurde eine UV-Lampe ins Wasser gelassen und dieses über Nacht bestrahlt. Dadurch wurde gewährleistet, dass alle Organismen, die sich noch im Wasser befanden, abgetötet wurden. Am darauffolgenden Tag wurde die Lampe entfernt und das Wasser, wie oben beschrieben, zweifach filtriert und in die Polycarbonatflaschen gefüllt.

Die in den Laborexperimenten eingesetzte *N. spumigena* CCY9414 Kultur wurde vor Beginn der Experimente in F/2 Medium angezogen. Das F/2 Medium wurde aus 1 L Milli-Q Wasser, in welchem 8 g künstliches Meersalz (8 ‰; Tropic Marine® Art. Nr. 10124, Dr. Biener GmbH) gelöst wurde, hergestellt. Anschließend wurde 1 mL 35 mM Phosphat (Na_2HPO_4 ; Endkonzentration $35 \mu\text{M}$) und 1 mL eines Metallmixes (Tabelle 3) hinzugegeben und mit 2N NaOH und HCl der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Das Medium wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen wurde 1 mL eines Vitaminmixes (Tabelle 4) steril hinzugegeben.

Tabelle 3) Zusammensetzung Metallmix. Für den Metallmix wurden zuerst vier separate Lösungen (a-d) hergestellt. Danach wurden die einzelnen Lösungen in nachfolgender Reihenfolge gemischt. 5 mL Lösung a wurden in 50 mL Lösung d gemischt. Anschließend wurde 5 mL Lösung b hinzugefügt und abschließend 5 mL Lösung c. Dieser Mix wurde mit 400 mL Milli-Q Wasser aufgefüllt, der pH-Wert mit 2N NaOH auf 7,5 eingestellt und abschließend wurde mit Milli-Q Wasser auf 500 mL aufgefüllt.

Lösung	Reagenzien	Einwaage	Bezogen auf
a	$\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,15 g	100 mL Milli-Q Wasser
	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,10 g	
	$\text{CoSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,12 g	
	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	2,00 g	
b	$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	5,00 g	100 mL Milli-Q Wasser
c	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,07 g	100 mL Milli-Q Wasser
d	$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	5,00 g	100 mL Milli-Q Wasser

Vier Wochen vor dem Start der Experimente wurden die Cyanobakterien in F/2 Medium überführt, das nur noch eine geringe Menge von Phosphat enthielt, so dass sie sich bei Start der Experimente in einem Phosphatmangel befanden. Der Salzgehalt betrug 9,2 ‰, welcher mittels eines Refraktometers gemessen wurde. Die Beprobung fand direkt nach Zugabe des Phosphats statt (t_0), sowie nach 24, 72, 120, 168 und 216 h. Zusätzlich wurde für die Quantifizierung von PolyP und dem POC in den ersten 24 h alle 3 h Proben entnommen. Ein zusätzliches Laborexperiment erfolgte unter der alleinigen Zugabe von Methylphosphonat (Endkonzentration 1,5 $\mu\text{mol/L}$) als organische Phosphorquelle.

Tabelle 4) Zusammensetzung Vitaminmixes. Der Mix wurde angesetzt, indem 0,1 mL Lösung a und 1,0 mL Lösung b mit 20 mg Thiaminiumdichlorid vermischt und auf 100 mL Milli-Q Wasser aufgefüllt wurden.

Lösung	Reagenzien	Einwaage	Bezogen auf
a	Vitamin B ₁₂	0,010 g	10 mL Milli-Q Wasser
b	Biotin	0,001 g	10 mL Milli-Q Wasser

Manuelle Phosphatbestimmung

Die manuelle Phosphatbestimmung erfolgte nach der Methode von Murphy und Riley (1962) und Johnson (1971), welche von Hansen (Hansen und Koroleff, 2007) modifiziert wurde. Während der Probennahme wurden 50 mL Wasser in einen Erlenmeyerkolben abgefüllt, 1 mL Mischreagenz (Tabelle 8) hinzugegeben und die Absorption bei 885 nm in einem Photometer (Shimadzu UV-1201V) gemessen (I). Anschließend wurden zu der Probe 0,5 mL Ascorbinsäure hinzugegeben und die Probe dunkel gestellt. Nach einer Stunde wurde erneut die Absorption bei 885 nm gemessen (II). Als Nullwert diente Milli-Q Wasser. Eine Standardreihe wurde zuvor in den Konzentrationen 2, 4, 6, 8 und 10 μM aus einer 1 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Stammlösung hergestellt und daraus ein Faktor berechnet. Da die Phosphatreagenzien sehr stabil sind, musste bei den Probenmessungen an den nächsten Tagen keine erneute Standardreihe gemessen werden.

Der Phosphorkonzentration wurde über folgende Formel berechnet:

$$\mu\text{M} = \frac{\text{Absorption der Probe (II)} - \text{Absorption der Trübung (I)}}{\text{Faktor}}$$

Bestimmung der Biomasse durch Zählung

Für die Bestimmung der Biomasse durch mikroskopische Zählung wurden bei jeder Beprobung 100 mL der Probe in 300 mL Braunglasflaschen gefüllt und mit 300 µL Lugolsche-Lösung (Willén, 1962) versetzt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur im Dunkeln bis zur Zählung gelagert.

Die Auszählung der Filamente erfolgte an einem Lichtmikroskop mit Phasenkontrast (Carl Zeiss "Axiovert S100"). Sowohl die Zählung als auch die Längen- und Durchmesser-Messungen der Filamente und die Zählung der Heterocysten je Filament, wurden mit der Software "ZENlite" (Carl Zeiss Microscopy, Jena) dokumentiert. Die Berechnung der Biomasse erfolge für die jeweiligen Organismen nach den Vorgaben der HELCOM (1988) und Olenina *et al.* (2006).

Tabelle 5) Zusammensetzung der Lugolschen-Lösung.

Reagenzien	Einwaage / Volumen
Milli-Q Wasser	200 mL
Kaliumiodid (KI)	20 g
Resublimiertes Jod (I ₂)	10 g
Eisessig (konz. CH ₃ COOH)	20 mL

Bestimmung von partikulärem organischem Kohlenstoff und Stickstoff

Definierte Probenvolumina wurden auf vorgeglühte (4 h bei 460 °C) GF/F-Filter (Ø 25 mm) filtriert und bei -20 °C gelagert. Die Filter wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut und auf Revolverplatten ausgelegt. Auf jeden zusammengefalteten Filter wurden drei Tropfen Milli-Q Wasser gegeben und anschließend wurden die Filter in den Vertiefungen der Revolverplatte entfaltet. Je drei Revolverplatten wurden übereinander in einen Exsikkator gestellt, dessen Boden mit 10 %iger HCl-Lösung gefüllte war. Nach 24 h wurden die Revolverplatten in einen anderen Exsikkator überführt, dessen Boden mit Silikaperlen befüllt war. Dieser Exsikkator wurde zur Trocknung der Filter bei 60 °C für 6 h in einen Heizschrank gestellt. Nach der Trocknung wurden die Filter in Zinnschiffchen verpackt und im Trockenschrank bei 60 °C bis zur Messung aufbewahrt.

Bestimmung von Chlorophyll a und Phaeopigmenten

Für die Bestimmung von Chlorophyll wurde ein definiertes Volumen der Wasserproben auf GF/F-Filter (\varnothing 25mm) filtriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die Analyse wurden die Filter in 10 mL Glasröhrchen überführt (ohne dass der Filter auftaute) und sofort 10 mL einer 96 %igen Ethanol-Lösung hinzugegeben. Die Glasröhrchen wurden mit Stopfen verschlossen, vorsichtig geschüttelt und für 3 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Glasröhrchen jede Stunde erneut geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Probe in eine saubere Küvette gefüllt und im Turner-Fluorometer mit einer Exzitation von 450 nm und einer Emission von 670 nm gegen 96 %iges Ethanol gemessen. In einer separaten Küvette wurden die Proben mit 100 μL 1 M Salzsäure versetzt und nach einer Inkubationszeit von 30 Sekunden erneut gemessen. Die Berechnung des Gehalts an Chlorophyll a und Phaeopigmenten erfolgte nach der Berechnungsformel von JGOFS (1994) und Knap *et al.* (1996).

$$\text{Chl. a (mgm}^{-3}\text{)} = F_m \times (1 \div (F_m - 1)) \times (F_o - F_a) \times K_x \times V_E \times (1 \div V_P)$$

$$\text{Phaeo. (mgm}^{-3}\text{)} = F_m \times (1 \div (F_m - 1)) \times [(F_m \times F_a) - F_o] \times K_x \times V_E \times (1 \div V_P)$$

Der Gesamtchlorophyllgehalt wurde dabei nach folgender Formel berechnet.

$$\text{Chl a gesamt (mgm}^{-3}\text{)} = F_o \times K_x \times V_E \times 1 \div V_P$$

F_m = Ansäuerungskoeffizient (F_o/F_a) für reines Chl. a

F_o = Messung ohne Ansäuerung

F_a = Messung nach Ansäuerung

K_x = Kalibrierungsfaktor vom reinen Chl. a

V_E = Extraktionsvolumen (mL)

V_P = Filtrationsvolumen (mL)

Bestimmung von Gesamtphosphor und gelöstem Phosphor

Für die Analyse des Gesamtphosphorgehalts und des gelösten Phosphors wurde die Methode nach Hansen und Koroleff (1983) gewählt. Während der Experimente wurden

Proben für die Bestimmung des Gesamtphosphors (TP) und des gelösten Phosphors (DP) genommen. Für die TP Bestimmung wurden 40 mL unfiltrierte Wasserprobe und für die Bestimmung von DP 40 mL vom Filtrat der POC Beprobung in 50 mL Zentrifugenröhrchen (Falcon) gefüllt und bei -20 °C eingefroren. Für die Analyse wurden die Proben aufgetaut und in Aufschlussgefäße einer Labor-Mikrowelle (CEM MarsXpress MD-2665 und Mars5Xpress MD-9926) überführt. Für den alkalischen Aufschluss wurden die Proben mit 4 mL Oxidationslösung (Tabelle 6) versetzt. Der Aufschluss erfolgte bei 180 °C in der Mikrowelle. Zwei Blanks (Milli-Q Wasser) und 1 mM Glucose-6-phosphat (Sigma-Aldrich) als Standard wurden bei jedem Aufschluss mitgeführt. Nachdem die Gefäße abgekühlt waren, wurde der Inhalt in Erlenmyerkolben überführt und die Trübung am Photometer bei 885 nm gemessen. Anschließend erfolgte die Zugabe von zuerst 0,8 mL Ascorbinsäure (Tabelle 7) und nach zweiminütiger Inkubation 0,8 mL Mischreagenz (Tabelle 8). Die Proben wurden für 20 min dunkel gestellt und anschließend wurden die Proben erneut am Photometer bei 885 nm gemessen. Die Phosphorkonzentration wurde nach der oben genannten Formel berechnet.

Tabelle 6) Zusammensetzung der Oxidationslösung. Alle Bestandteile werden in 500 mL Milli-Q Wasser gelöst.

Reagenzien	Einwaage
Kaliumperoxidsulfat	25 g
Borsäure	15 g
Natriumhydroxidlösung	7,5 g

Tabelle 7) Reagenzien für Phosphorbestimmung.

Reagenzien	Einwaage / Volumen
Ascorbinsäure	7 g in 100 mL Milli-Q Wasser
Ammoniummolybdat	9,5 g in 100 mL Milli- Q Wasser
Kaliumantimonyltartrat	3,25 g in 100 mL Milli-Q Wasser
4,5 M H ₂ SO ₄	250 mL konz. (98 %) H ₂ SO ₄ + 750 mL Milli-Q Wasser
Kaliumdihydrogenphosphat (10 µM PO ₄ ³⁻ /mL)	136,1 mg in 100 mL Milli-Q Wasser

Tabelle 8) Zusammensetzung der Mischreagenz für Phosphorbestimmung.

Reagenzien	Volumen
Ammoniummolybdat	45 mL
Kaliumantimonyltartrat	5 mL
4,5 M H ₂ SO ₄	200 mL

Quantifizierung von Polyphosphat

Die Quantifizierung von PolyP erfolgte in leicht abgewandelter Form der Methode von Martin und Van Mooy (2013). Während der Beprobung der Experimente wurde zu jedem Zeitpunkt ein definiertes Volumen für die PolyP Analyse auf einen Polycarbonat-Membranfilter (\varnothing 25 mm, Porengröße 3 μ m) filtriert. Pro Experiment, Flasche und Zeitpunkt wurden zwei Filter hergestellt, sodass insgesamt pro Probenzeitpunkt 6 Replikate zur Verfügung standen. Unmittelbar nach der Filtration wurden die Filter in 2 mL Eppendorf Gefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Für die Quantifizierung von PolyP wurde eine Standardreihe von 0,11 μ M bis 7 μ M PolyP aus einer 1 mM Stammlösung (Sigma-Aldrich S4379) und HEPES-Pufferlösung hergestellt. Aus den gewonnenen Konzentrationen wurden Aliquotes hergestellt und bei -20 °C eingefroren. Bei jeder Probenbehandlung wurden zwei Standardreihen in der gleichen Art und Weise bearbeitet. Proben und Standardreihen wurden auf Eis aufgetaut. Die Proben wurden mit 0,5 mL TRIS-Puffer versetzt. Zu jeder Probe sowie zu den zwei Standardreihen und zu zwei Blanks wurden anschließend zwei Spatelspitzen Glasperlen (0,1 mm; BioSpec 11079101) gegeben, die Eppendorf-Gefäße verschlossen und für 3 min im Disruptor (Scientific Industries, Disrupter Genie Digital) bei maximaler Geschwindigkeit von 2500 rpm geschüttelt. Um die Vakuolen der Cyanobakterien zu zerstören, wurden die Proben anschließend für 5 min im Wasserbad gekocht und dann für 10 min auf Eis abgekühlt. Um Interferenzen bei der Messung mit DNA und RNA zu vermeiden, wurden die Proben mit je 2,5 μ L DNase (2U/ μ L; Stammlösung von Roche 04716728001 mit 10 U/ μ L) und RNase (ambio AM2286) versetzt und im Thermomixer bei 37 °C für 10 min unter Schütteln inkubiert.

Tabelle 9) Zusammensetzung HEPES Puffer. Angaben für 1 L; pH-Wert von 7,5 mittels 2M NaOH Lösung eingestellt.

Reagenzien	Einwaage / Volumen
100 mM NaCl	5,84 g
20 mM HEPES	4,77 g
2 mM MgCl ₂	2,22 mL einer 900 mM Stammlösung
2 mM EDTA	4 mL

Im Anschluss daran erfolgte für 10 min der Verdau mit 5 μ L Proteinase K (VWR Life Science E195-5ML, 20 mg/mL) bei 37 °C im Thermomixer (Cell Media Thermomixer pro). Danach wurden die Proben für 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Von jedem Probenüberstand wurden 42 μ L in ein Well einer NUNC-Platte pipettiert (Greiner bio one 655076) und mit 5 μ L 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; 1 mg/mL; Sigma D9542-1MG) und 250 μ L HEPES-Pufferlösung gemixt. Die Mikrotiterplatte wurde sofort in den Plattenreader (TECAN infinite M200 pro) gegeben und bei einer Exzitation von 415 nm und einer Emission von 550 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden in μ mol/L berechnet und auf μ mol POC normalisiert.

Quantifizierung von ATP

Für die Quantifizierung von ATP wurde die Methode von Björkman und Karl (2001) in leicht abgewandelter Form angewendet. ATP ist sehr sensibel für einen enzymatischen Abbau und daher mussten die Proben, nachdem sie auf \varnothing 25 mm GF/F Filter (Millipore HA/GS) filtriert wurden, sofort extrahiert werden. Hierfür wurden die Filter nach der Filtration in Gasröhrchen mit 3 mL kochender TRIS-Pufferlösung gegeben. Die Gasröhrchen wurden fest verschlossen und für 5 min im Wasserbad gekocht. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt. Das Extrakt wurde in Kryoröhrchen überführt, das Gasröhrchen mit 1 mL TRIS-Puffer nachgespült und zu den 3 mL im Kryoröhrchen hinzugegeben. Die Kryoröhrchen wurden bei -80 °C weggefroren. Zur Herstellung des Firefly-Lantern-Extract-250 (FLE250) wurden 25 mL steriles Milli-Q Wasser unter sterilen Bedingungen in eine FLE-Ampulle (Merck, FLE250-1VL) gegeben. Diese wurde geschüttelt und für 4 min gevortext. Zum Altern dieser FLE250 Lösung, wurde sie über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde die FLE250 Lösung durch geglühte GF/F Filter filtriert und in sterile, braune Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Der FLE-Mix wurde, wie in Tabelle 11 gezeigt, angesetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde er bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und schnellstmöglich verwendet. Für die quantitative Messung wurden die Extrakte auf Eis aufgetaut und anschließend gevortext. Dann wurde jeweils 1 mL des Extrakts in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses wurde für 8 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Probe wurde gevortext und anschließend in ein Well einer

Mikrotiterplatte (NUNC-Platte) pipettiert. Alle Proben wurden am TECAN infinite M200 pro Plattenreader gegen eine ATP-Standardreihe (Sigma-Aldrich A2383) gemessen. Insgesamt wurden acht Messungen je Well vorgenommen. Dabei erfolgte die Zugabe des FLE-Mixes (jeweils 80 μ L) nach dem dritten Zyklus, so dass drei Messungen ohne und fünf Messungen mit dem FLE Mix aufgenommen wurden.

Tabelle 10) Lösungen für die ATP Quantifizierung. Alle Werte sind auf 500 mL bezogen; pH-Wert von 7,4 mittels 2 M NaOH Lösung eingestellt. Anschließend wurden die Lösungen autoklaviert.

Reagenzien	Einwaage
40 mM MgSO₄	4,93 g
20 mM Tris-HCl Puffer	1,58 g
20 mM Tris-Puffer (Trizma / Tris Base)	1,21 g

Tabelle 11) Zusammensetzung des FLE-Mixes für 10 mL Gesamtvolumen.

Reagenzien	Volumen
FLE250-Lösung	2 mL
40 mM MgSO ₄	4 mL
20 mM Tris-Puffer (Trizma / Tris Base)	4 mL

Quantifizierung von Lipiden

Für die Analyse der Lipidzusammensetzung wurde die Methode nach Bligh und Dyer (1959) genutzt, welche von Kruse *et al.* (2015) und Siebers *et al.* (2016) modifiziert wurde und der eine schrittweise Extraktion der Proben mit zwei Chloroform/Methanol Gemischen zugrunde liegt. Für die Lipid-Analyse wurden die Proben von den PC-Filtern mit 1,5 mL Milli-Q Wasser in ein Eppendorf-Röhrchen gespült und im Wasserbad bei 100 °C für 15 min gekocht, um die Lipaseaktivität zu inaktivieren. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgezogen. Die Zellpellets wurden bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Für die Analyse wurden die Proben aufgetaut und mit 1 vol Chloroform:Methanol (CHCl₃:MeOH; Chloroform für Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv® Bestellnummer: 106018) im Verhältnis 1:2 (v/v) versetzt und für 30 min auf einem Schüttler bei 150 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 min lang bei 14000 rpm zentrifugiert (Eppendorf miniSpin plus). Die organische Lipidphase wurde entnommen, ohne das Pellet zu zerstören und in ein Glasröhrchen überführt. Das Pellet wurde erneut in 1 vol CHCl₃:MeOH 2:1 (v/v) gelöst und für 30 min auf dem Schüttler bei 150 rpm inkubiert. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurde die

Lipidphase abgenommen und zu der dazugehörigen Probe des ersten Extraktionsschrittes überführt. Das Pellet zeigte nun eine weiße Färbung, so dass keine weitere Extraktion durchgeführt werden musste. Die Glasgefäße wurden mit einem Schraubverschluss, welcher auf der Innenseite ein Teflon Septum besaß, verschlossen. Die Proben durften ab diesem Zeitpunkt keinen Kontakt mehr mit Plastik bekommen, da sich ablösende Partikel die Schläuche des Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometers (Q-TOF) verstopfen können. Die Glasgefäße wurden bei 4 °C stehend gelagert.

Die Messung der Proben wurde am Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen der Universität Bonn durchgeführt. Hierfür wurden die Proben in einer Kühlbox mit Kühllakus nach Bonn transportiert. Dort wurden die Extrakte in den Glasgefäßen mit einem Gemisch aus je 1 vol CHCl_3 , 1 vol MeOH und 0,75 vol eines 300 mM Phosphatpuffers (Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 und Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4) versetzt. Die Proben wurden gevortext und für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde die untere Lipidphase (Chloroformphase) abgenommen und in ein neues Glasröhrchen überführt. Zu der übrig gebliebenen wässrigen Phase wurden erneut 200 μL CHCl_3 :MeOH im Verhältnis 2:1 (v/v) gegeben, gevortext und für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die untere, organische Phase wurde abgenommen und mit der dazugehörigen Chloroformphase der vorhergehenden Extraktion kombiniert. Die kombinierten Phasen wurden anschließend mittels eines Probenkonzentrators (Techne Sample Concentrator) verdampft, sodass nur noch ein fester Rückstand im Glasröhrchen übrig blieb. Dieser Rückstand wurde in dem Q-TOF Laufmittel für die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) gelöst und bis zur Messung am Q-TOF im Kühlschrank gelagert. Die Messungen erfolgten gegen interne Standards der jeweiligen Lipidgruppen, wobei es sich um gesättigte Fettsäuren handelte. Die Ergebnisse wurden in nmol/L berechnet und auf $\mu\text{mol/L}$ POC normalisiert, sowie ein prozentuales Verhältnis berechnet. Die Proben der Freilandexperimente wurden auf ihren Gehalt an Mono- und Digalaktosyldiacylglycerin (MGDG und DGDG), Sulfoquinovosyldiacylglycerin (SQDG) und Phosphatidylglycerin (PG) untersucht. Die Proben der Laborexperimente wurden neben PG noch auf Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylcholin/Lecithin (PC) untersucht. Für alle Lipidklassen wurde des Weiteren die Zusammensetzung der Fettsäuren bestimmt.

Stickstofffixierung

Sowohl in den Experimenten während der Ausfahrt, als auch im Labor wurde je Probennahmezeitpunkt die Stickstofffixierungsrate bestimmt. Hierfür wurden je 640 mL Wasser aus den drei Versuchsflaschen in Glasflaschen überführt und gasfrei (ohne headspace) mit einem Septum und Deckel verschlossen. Anschließend wurde in jede der Flaschen 250 μL $^{15}\text{N}_2$ Gas mittels einer Gasinjektionsspritze gegeben (Abbildung 6 D). Die Flaschen wurden für 5 min leicht geschwenkt, damit sich der markierte Stickstoff verteilen konnte. Auf der Ausfahrt wurden die Flaschen liegend für 24 h in einem Wasserbad mit *in-situ* Wasser- und *in-situ* Lichtbedingungen an Deck inkubiert. Bei den Laborexperimenten wurden diese Flaschen liegend im 15 °C Kühlraum gelagert. Nach 24 h wurde das Wasser der Flaschen auf geglühte GF/F-Filter filtriert und die Filter in Eppendorf-Röhrchen bei -80 °C weggefroren. Für die Analyse wurden die Filter im Trockenschrank bei 60 °C über Nacht getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Filter in Zinnschiffchen verpackt und bis zur Messung am Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IR-MS) bei 60 °C im Trockenschrank gelagert. War auf den Filtern zu viel Probenmaterial, so wurde der Filter in zwei Hälften geschnitten und jede Hälfte wurde in ein separates Zinnschiffchen verpackt. Nach der Analyse wurden diese Ergebnisse dann addiert. Die Auswertung und Berechnung der Stickstofffixierungsrate und Turnover-Zeit erfolgte nach den Berechnungen von Montoya *et al.* (1996). Die volumetrische Stickstofffixierungsrate wurde auf POC normalisiert, wohingegen die Turnover-Zeit aus der Umkehrung der spezifischen Stickstofffixierungsrate berechnet wurde.

Polyphosphatlokalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Je 2 mL Probenmaterial wurden mit einem Unterdruck von 150 mbar auf 3 μm Polycarbonat-Membranfiltern (\varnothing 25 mm) filtriert und an der Luft in kleinen Plastikpetrischalen getrocknet. Anschließend wurde 1 mL DAPI (1 mg/100 mL) auf je einen Filter aufgetragen und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die DAPI-Lösung abfiltriert und der Filter mit 1 mL Milli-Q Wasser gewaschen. Die Filter wurden mit einem Laser-Mikrodissektionsmikroskop (LMD 7000; Leica Camera, Wetzlar) und der zugehörigen Software "LMD V7.6" analysiert. Interessante Zellstrukturen (regions of interest – ROIs) wurden mit einem Laser für die anschließende Analyse im Rasterelektronenmikroskop und NanoSIMS markiert.

NanoSIMS-Messungen

Die Messungen erfolgten am NanoSIMS 50 L (Cameca, Frankreich). Die zuvor markierten Filter wurden mit einem Sputter Coater (108auto, Cressington, UK) im Vakuum von 0,05 mbar bei 25 mA mit ca. 30 nm Gold beschichtet. Für die Messungen im NanoSIMS wurden 10 Filamente aus den verschiedenen Probenahmezeitpunkten ausgewählt. Diese wurden mit einem $^{133}\text{Cs}^+$ Primärionenstrahl analysiert. Die Bilder der empfangenen Sekundärionen $^{12}\text{C}^-$, $^{16}\text{O}^-$, $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, und $^{31}\text{P}^-$ wurden parallel mittels Massendetektoren mit Sekundärelektronenvervielfacher (Hamamatsu) aufgenommen. Die Massenauflösung betrug > 8000 (nach der Definition von CAMECA). Um den stationären Zustand der sekundären Ionenbildung zu erreichen, um die Goldbeschichtung abzutragen und um die Oberfläche zu reinigen, wurden vor der Analyse Probenbereiche von $60 \times 60 \mu\text{m}$ für 200 s mit 600 pA erodiert. In einem ersten Schritt wurde der zu untersuchende Bereich mit einem 1 pA-Primärionenstrahl in einem Feld von $512 \times 512 \text{ px}$ mit 0,25 ms/px, abgetastet und dargestellt. Bei dieser ersten Analyse wurden die Cyanobakterien kaum abgetragen oder beschädigt. Um in kürzerer Zeit in eine größere Tiefe vorzudringen und die Verteilung auch im Innern der Zellen darzustellen, wurden die nachfolgenden Analysen mit einem 20 pA-Primärionenstrahl auf einem $35 \times 35 \mu\text{m}$ Raster durchgeführt, der $512 \times 512 \text{ px}$ mit 2 ms/px scannte. Nach 410 Ebenen waren die ca. 8 μm im Durchmesser messenden Cyanobakterien vollständig abgetragen. Ausgehend von einer idealen zylindrischen Form der Cyanobakterien, ergab sich eine geschätzte Abtragung von 20 nm pro gemessener Ebene. Die vorherige Implantation und Analyse mit einem schwächeren Ionenstrahl hatte bereits Material verbraucht und da die Cyanobakterien möglicherweise einen komprimierten ellipsoiden Querschnitt haben, könnte die reale Erosion geringer sein. Man sollte aber beachten, dass das Material in der Oberflächenschicht durch den eindringenden Ionenstrahl vermischt wurde, was zu Ionenbeiträgen von wenigen zusätzlichen nm führt. Von den 410 aufgenommenen Ebenen, wurden die Ebenen 106 bis 245 verwendet, um die Phosphorverteilung darzustellen. Für die Datenanalyse wurde die Software Look@NanoSIMS (Polerecky *et al.*, 2012) eingesetzt.

Rasterelektronenmikroskopie

Die REM-Analysen wurden in 20 zuvor markierten Filamenten von *N. spumigena* an einem "Zeiss MERLIN VP compact" Gerät unter Benutzung des Software-Programms "AZtecEnergy" (Oxford Instruments) durchgeführt. Vor der Analyse wurden die Proben mit Chrom beschichtet, um Wellenlängeninterferenzen des Phosphors mit denen von Gold, das normalerweise für die Beschichtung von Proben verwendet wird, zu verhindern. Die Messungen erfolgten im Hochvakuum bei 10^{-6} mbar mit einer Beschleunigungsspannung von 15 keV. Die Messwerte sind nicht-korrigierte Röntgenstrahlenwerte mit einem Anregungsenergiepeak von 2,0134 keV in „counts s⁻¹“ für Phosphor. Des Weiteren wurden die Signalintensitäten von Kalzium, Schwefel, Stickstoff und Magnesium gemessen. Kalzium und Magnesium gelten dabei als Gegenionen zum Phosphor (Baxter und Jensen, 1980).

Statistische Tests

Es wurden zwei zweiseitige statistische Methoden verwendet. Der t-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den vegetativen Zellen und den Heterocyten bei jedem Probenentnahmezeitpunkt zu finden. Die Messwerte wurden bei Punktmessungen aus dem Erregungsenergiepeak des Phosphors berechnet. Um die signifikanten Unterschiede im Phosphorgehalt von vegetativen Zellen und Heterocyten zu verschiedenen Zeitpunkten zu testen, wurde eine Varianzanalyse (Analysis of Variance; ANOVA) durchgeführt (<http://www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html>).

Ergebnisse

Untersuchungen der Phosphataufnahme einer natürlichen Cyanobakteriengemeinschaft der Ostsee

Die Freilandexperimente wurden an drei verschiedenen Stationen in der Ostsee durchgeführt. Das Oberflächenwasser an den Stationen besaß unterschiedliche Ausgangsbedingungen in Bezug auf den Phosphatgehalt (Tabelle 12). Dadurch ergaben sich unterschiedliche Ernährungszustände der Cyanobakterien sowie eine unterschiedliche Zusammensetzung der Biomasse.

Die Entwicklung der Phosphatkonzentration während der Freilandexperimente

Die Phosphatkonzentrationen (gelöster anorganischer Phosphor, DIP) im Oberflächenwasser der Stationen zum Zeitpunkt der Probennahme betrugen 0,28 $\mu\text{mol/L}$ an Station 213, an Station 245 0,04 $\mu\text{mol/L}$ und an Station 282 0,00 $\mu\text{mol/L}$. Nach Zugabe vom Phosphat (Tabelle 12) ergaben sich somit Endkonzentrationen von 2,82 $\mu\text{mol/L}$ (Station 213), 0,63 $\mu\text{mol/L}$ (Station 245) und 0,94 $\mu\text{mol/L}$ (Station 282). DIP nahm im Experiment an Station 213 im Verlauf der 168 h nur geringfügig ab und erreichte einen Wert von $2,67 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$ (Abbildung 10 A). An Station 245 sank DIP innerhalb von 24 h um 33 % auf $0,23 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$. Nach weiteren 24 h war kein DIP mehr im Wasser messbar und blieb bis zum Ende des Experiments nach 168 h an der Nachweisgrenze von 0,02 μM (Abbildung 10 B). Ein nahezu identischer Verlauf wurde an Station 282 gemessen. Hier nahm die Konzentration innerhalb der ersten 24 h um mehr als 75 % auf einen Wert von $0,15 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$ ab. Nach weiteren 24 h konnten noch $0,02 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$ DIP gemessen werden. Nach einer Inkubationszeit von 120 h wurde kein DIP mehr gemessen, was bis zum Ende des Experiments nach 168 h anhielt (Abbildung 10 C).

Tabelle 12) Die Ausgangskonzentration von Phosphat an den Stationen der Freilandexperimente. Das Wasservolumen in den Inkubationsflaschen betrug $23,5 \pm 0,3 \text{ L}$, so dass es zu Abweichungen zwischen der gemessenen Endkonzentration und der berechneten Phosphatzugabe kam.

Station	213	245	282
Phosphatkonzentration vor Zugabe ($\mu\text{mol/L}$)	0,28	0,04	0,00
Zugegebenem Phosphatmenge ($\mu\text{mol/L}$)	2,50	0,50	1,00
Endkonzentration bei t_0 ($\mu\text{mol/L}$)	2,82	0,63	0,94

Die Entwicklung der Biomasse gemessen am POC, PON und dem Chlorophyllgehalt

Zu Beginn des Experiments an Station 213 wurde eine Cyanobakterien-Biomasse von $62,54 \pm 1,52 \mu\text{mol C/L}$ gemessen. Innerhalb von 120 h nahm die Biomasse um 61 % auf $100,76 \mu\text{mol C/L}$ zu, bevor ein Rückgang zum Ende des Experiments auf $52,62 \pm 2,05 \mu\text{mol C/L}$ beobachtet wurde. An Station 245 konnte von Beginn an ein Rückgang der Biomasse von $117,48 \pm 5,95$ auf $68,38 \pm 16,38 \mu\text{mol C/L}$ verzeichnet werden, was einer Abnahme von 42 % entsprach. Einen ähnlichen Verlauf zeigte die Entwicklung der Biomasse an Station 282. Der anfängliche Wert von $296,37 \pm 9,07 \mu\text{mol C/L}$ sank innerhalb von 120 h um 38 % auf $183,94 \pm 7,33 \mu\text{mol C/L}$. Eine erneute Zunahme konnte in den letzten 48 h verzeichnet werden, bei der die Biomasse auf $214,17 \pm 9,14 \mu\text{mol C/L}$ anstieg (Abbildung 7 A). In allen drei Experimenten war der Hauptvertreter der Cyanobakteriengemeinschaft *N. spumigena*. *Aphanizomenon* sp. kam in den Experimenten an den Stationen 213 und 245 vor. Es konnte allerdings ein Rückgang dieser Art nach 24 bzw. 72 h beobachtet werden. Zum Ende der drei Experimente stieg die Biomasse von *Dolichospermum* sp. an, welche aber nur 1 - 2 % der Gesamtbiomasse ausmachte (Abbildung 8 A - C).

Die PON-Konzentration an Station 213 änderte sich von einem Ausgangswert von $9,95 \pm 1,62 \mu\text{mol N/L}$ kaum und am Ende des Experiments konnten $13,08 \pm 3,23 \mu\text{mol N/L}$ gemessen werden. In dem Experiment an Station 245 zeigte sich in den ersten 24 h ein Anstieg der PON-Konzentration um 154 %, von $6,56 \pm 1,32$ auf $16,63 \pm 1,51 \mu\text{mol N/L}$. Bis zum Ende des Experiments sank die Konzentration wieder auf $6,80 \pm 1,49 \mu\text{mol N/L}$. An Station 282 konnte anfänglich keine große Veränderung der PON-Konzentration gemessen werden. Die Konzentration war mit $43,65 \pm 2,72 \mu\text{mol N/L}$ von Anfang an recht hoch und sank innerhalb von 120 h auf $26,32 \pm 1,34 \mu\text{mol N/L}$. In den letzten 24 h konnte eine erneute Zunahme auf $30,69 \pm 0,94 \mu\text{mol N/L}$ gemessen werden (Abbildung 7 B).

An Station 213 nahm Chlorophyll a innerhalb von 72 h von $0,144 \pm 0,008$ auf $0,079 \pm 0,002 \text{ nmol Chl. a}/\mu\text{mol POC}$ ab und veränderte sich anschließend nur noch geringfügig. An Station 245 nahm der Gehalt von anfänglichen $0,064 \pm 0,003 \text{ nmol Chl. a}/\mu\text{mol POC}$ im Verlauf von 120 h kontinuierlich auf $0,019 \pm 0,002 \text{ nmol Chl. a}/\mu\text{mol POC}$ ab. In den letzten 48 h stieg der Wert auf

$0,032 \pm 0,006$ nmol Chl. a/ μ mol POC. Der Chlorophyll a-Gehalt an Station 282 ging innerhalb von 24 h von $0,079 \pm 0,004$ auf $0,029 \pm 0,001$ nmol Chl. a/ μ mol POC zurück. Dieser Wert änderte sich im weiteren Verlauf kaum (Abbildung 7 C).

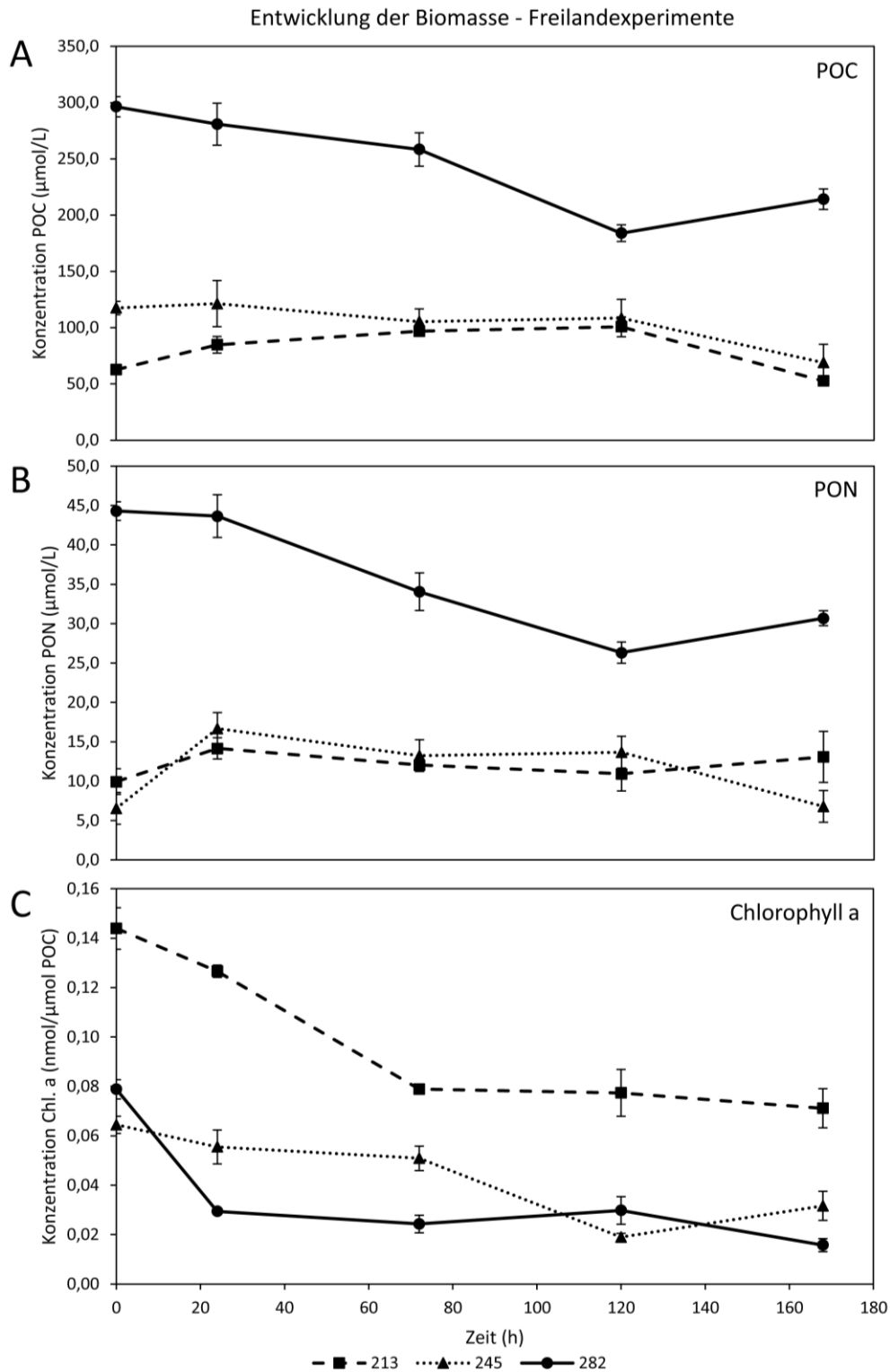


Abbildung 7) Veränderung der Biomasse über die Zeit in den Freilandexperimenten, angezeigt durch: A) Die Veränderung der POC-Konzentration. B) Die Veränderung PON-Konzentration C) Die Veränderung der Chlorophyll a-Konzentration, welche auf μ mol POC normalisiert wurde.

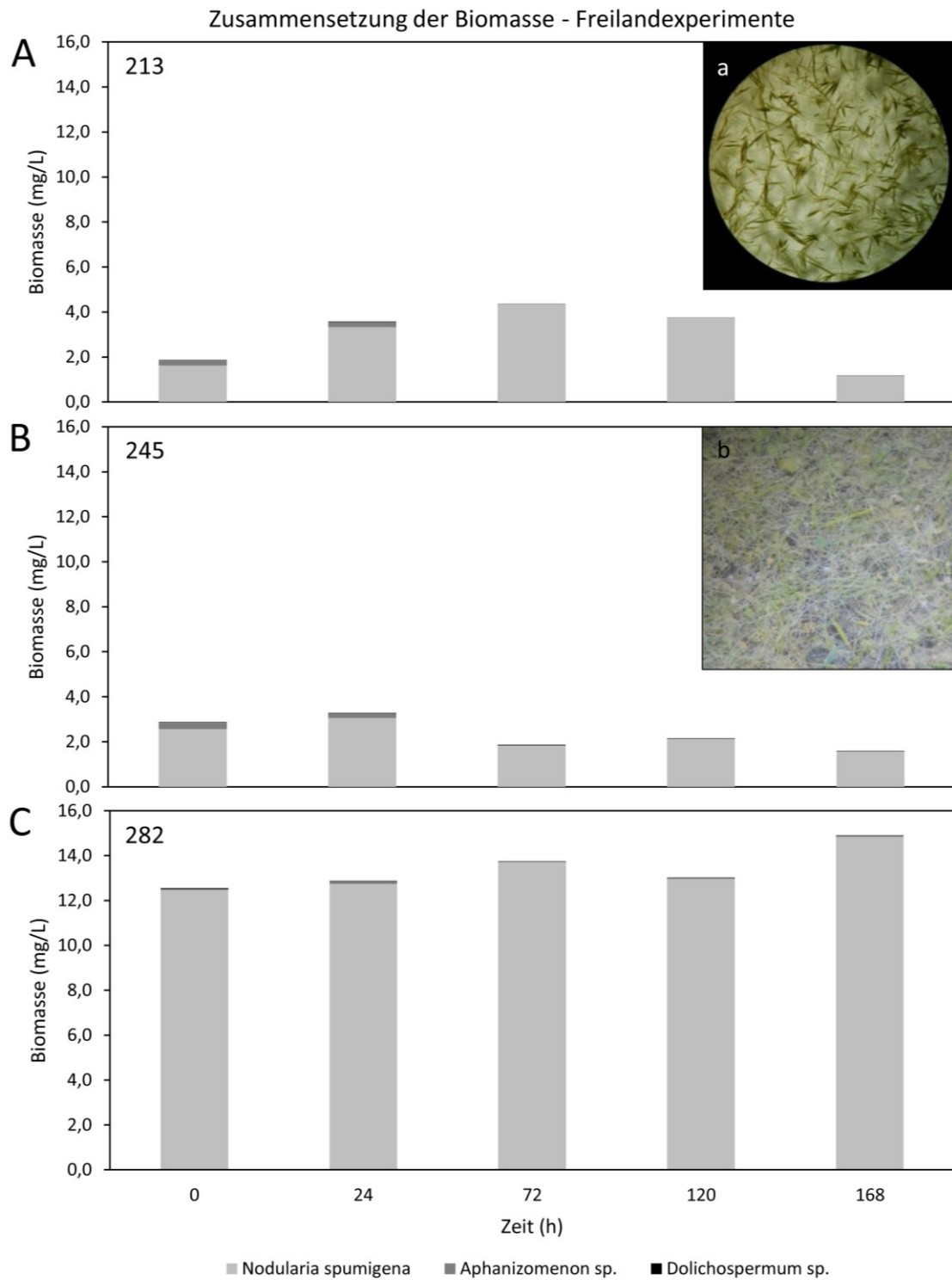


Abbildung 8) Veränderung der Zusammensetzung der Biomasse über die Zeit in den Freilandexperimenten. *N. spumigena* dominierte in allen Experimenten die Gemeinschaft. A) Die Zusammensetzung der Biomasse an Station 213 (a). *Aphanizomenon sp.* nahm innerhalb von 24 h ab. B) Die Zusammensetzung der Biomasse an Station 245 (b). *Aphanizomenon sp.* nahm innerhalb von 72 h ab. C) Die Zusammensetzung der Biomasse an Station 282. *N. spumigena* war Hauptvertreter in diesem Experiment.

Die Änderungen der Phosphorfraktionen

Die Entwicklung der Phosphatkonzentrationen wurde bereits oben beschrieben. Bei den anderen Phosphorfraktionen kam es im Experiment an Station 213 zu geringfügigen Änderungen von TP, DOP und POP. TP lag um $3,54 \pm 0,16 \mu\text{mol/L}$, DOP um $0,19 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$ (Anteil am TP von etwa 4 %) und POP um $0,53 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$ (Anteil am TP von etwa 16 %; Abbildung 9 A und 10 A). An Station 245 nahm der TP-Wert bis zum Ende des Experiments von anfänglichen $1,26 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$ um 60 % auf $0,51 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$ ab. DOP verändert sich kaum und blieb konstant um $0,24 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$ (Anteil am TP von etwa 27 %). Für POP wurde in den ersten 72 h eine Zunahme um 93 % von $0,41 \pm 0,03$ auf $0,79 \pm 0,09 \mu\text{mol P/L}$ gemessen. Bis zum Ende des Experiments nahm dieser Wert kontinuierlich ab und betrug dann $0,29 \pm 0,04 \mu\text{mol P/L}$ (Abbildung 9 B). Dieser Verlauf ließ sich auch in der prozentualen Berechnung am TP zeigen. Der Anteil von POP am TP stieg innerhalb von 72 h um 41 %, bevor er wieder abnahm (Abbildung 10 B). Die TP-Konzentration an Station 282 sank von $2,07 \pm 0,06$ auf $1,44 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$ (- 30 %). Die Konzentration an DOP ändert sich nur geringfügig und blieb konstant bei $0,24 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$ (Abbildung 9 C), wobei in der Anteilsberechnung von DOP am TP eine Erhöhung um etwa 10 % zu verzeichnen war (Abbildung 10 C). Für POP konnte in den ersten 24 h eine Zunahme von $0,91 \pm 0,06$ auf $1,60 \pm 0,07 \mu\text{mol P/L}$ gemessen werden, was einer Erhöhung um 76 % entsprach. Anschließend sank der Wert bis zum Ende des Experiments auf $1,14 \pm 0,05 \mu\text{mol P/L}$ (Abbildung 9 C). Dieser Verlauf ließ sich ebenfalls in der prozentualen Berechnung am TP zeigen. Der Anteil von POP am TP stieg innerhalb von 24 h um 37 %, anschließend blieb dieser Wert stabil bei einem Anteil von etwa 80 % (Abbildung 10 C).

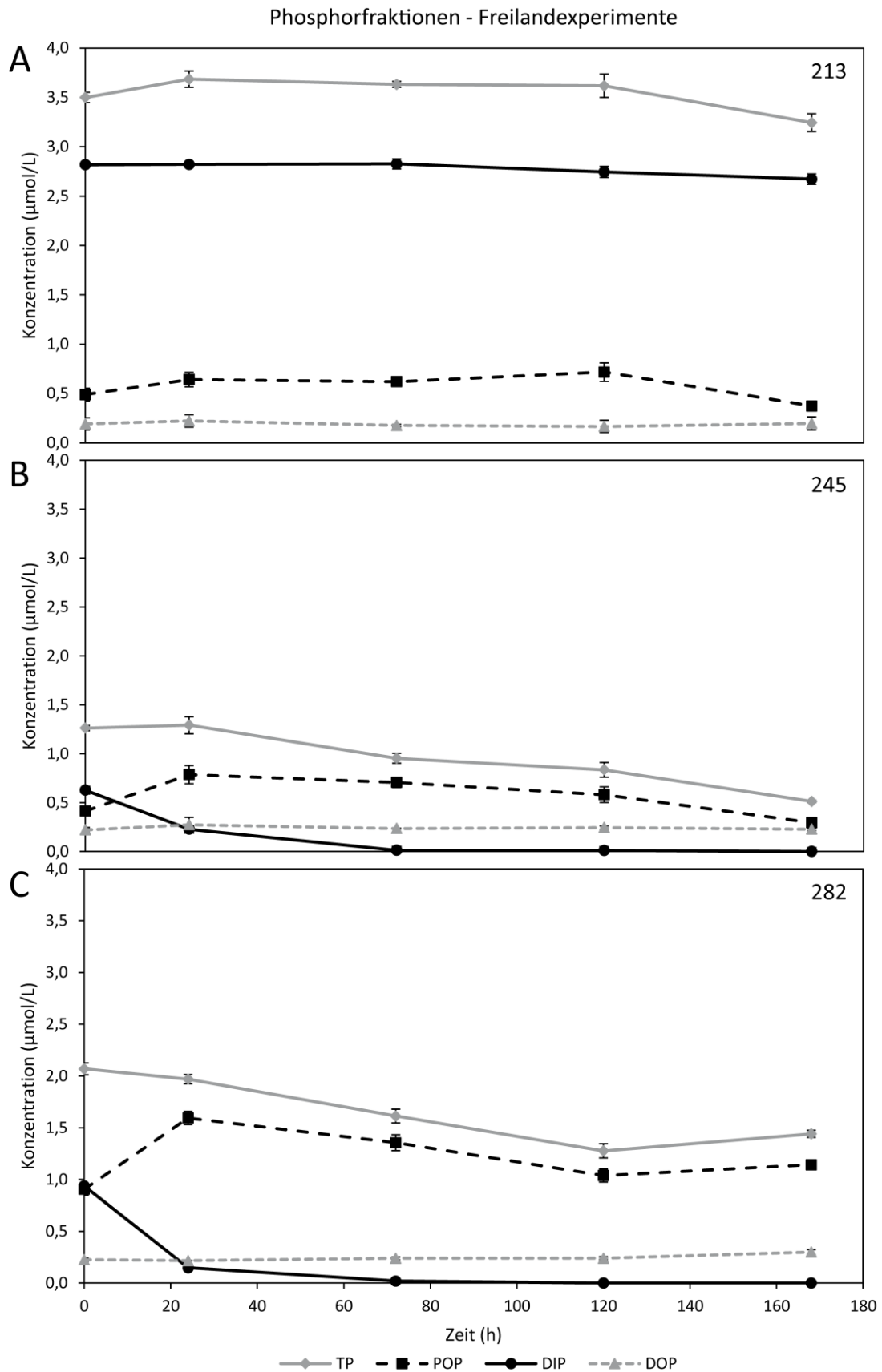


Abbildung 9) Veränderung der Konzentrationen der Phosphorfraktionen über die Zeit in den Freilandexperimenten. A) Der Verlauf im Experiment an Station 213, in dem es zu keinen Änderungen kam. B) Die Veränderung im Experiment an Station 245. C) Die Veränderung im Experiment an Station 282.

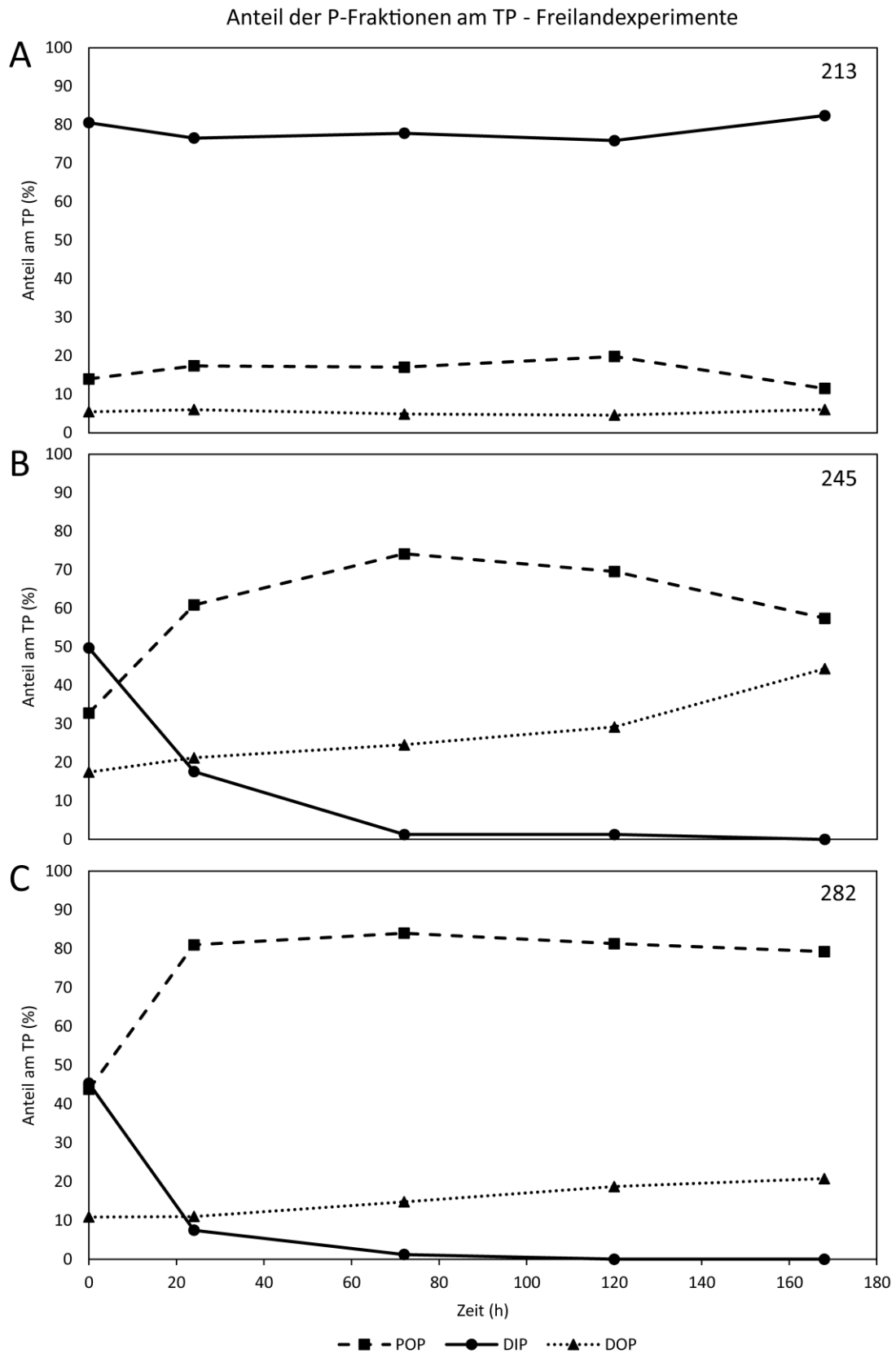


Abbildung 10) Veränderung der Phosphorfractionen über die Zeit in den Freilandexperimenten. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der einzelnen Fractionen gemessen am TP. A) Der Verlauf im Experiment an Station 213, in dem die Fractionen über den Untersuchungszeitraum gleichblieben. B) Die Veränderung im Experiment an Station 245. C) Die Veränderung im Experiment an Station 282.

Veränderungen der C:P und N:P Stöchiometrie

An Station 213 erhöhte sich das C:P Verhältnis innerhalb von 72 h um 22 % und ging bis zum Ende des Experiments anschließend leicht zurück. Das N:P Verhältnis stieg in den letzten 48 h um mehr als das Doppelte (Abbildung 11 A). An Station 245 konnte in den ersten 24 h ein Rückgang des C:P Verhältnisses von 48 % gemessen werden. Dieses Verhältnis nahm jedoch in den letzten 48 h des Experiments um 52 % zu und nähert sich wieder dem Ausgangsverhältnis. Das N:P Verhältnis änderte sich nur geringfügig (Abbildung 11 B). Das C:P Verhältnis im Experiment an Station 282 nahm innerhalb von 24 h um 46 % ab und blieb bis zum Ende des Experiments nahezu im selben Verhältnis. Das N:P Verhältnis sank in den ersten 24 h um 45 % und blieb anschließend im selben Verhältnis (Abbildung 11 C).

Veränderungen der phosphorreichen Zellkomponenten PolyP und ATP sowie der Lipidzusammensetzung

Polyphosphat-Gehalt

In den Experimenten an Station 213 sank der PolyP-Gehalt von Beginn der Inkubation an. Nach 72 h wurden $4,66 \pm 0,23$ nmol/ μ mol POC gemessen. Bis zum Ende des Experiments veränderte sich dieser Wert nur noch geringfügig. An Station 245 stieg der Gehalt innerhalb von 24 h von $1,87 \pm 0,05$ nmol/ μ mol POC um 150 % auf $4,67 \pm 0,37$ nmol/ μ mol POC. Anschließend sank der Wert stetig und erreichte am Ende des Experiments nach 168 h einen Wert von $3,46 \pm 0,61$ nmol/ μ mol POC. An Station 282 nahm PolyP in den ersten 24 h von $1,42 \pm 0,16$ auf $3,72 \pm 0,37$ nmol/ μ mol POC zu, was einer prozentualen Zunahme von 162 % entsprach. Bis zum Ende der Inkubationszeit wurde ein stetiger Abfall des PolyP-Wertes bis auf $2,26 \pm 0,04$ nmol/ μ mol POC beobachtet (Abbildung 12).

ATP-Gehalt

Die Messung des ATP-Gehalts zeigte an Station 213 vom Beginn bis zum Ende des Experiments eine Zunahme von $0,030 \pm 0,001$ auf $0,060 \pm 0,016$ nmol ATP-P/ μ mol POC. Damit verdoppelte sich der Gehalt. An Station 245 sank der ATP-Gehalt zunächst und nahm nach 24 h erneut zu. Nach 120 h konnte ein Gehalt von $0,044 \pm 0,001$ nmol ATP-P/ μ mol POC gemessen werden, was einem Zuwachs von 63 % entsprach. Der ATP-Gehalt sank ebenfalls an Station 282 zu Beginn der Inkubation. Nach 24 h konnte eine

Zunahme von $0,015 \pm 0,004$ auf $0,029 \pm 0,002$ nmol ATP-P/ μ mol POC gemessen werden, was einer Zunahme von 93 % entsprach. Am Ende des Experiments wurde ein Wert von $0,017 \pm 0,003$ nmol ATP-P/ μ mol POC gemessen. (Abbildung 13 A)

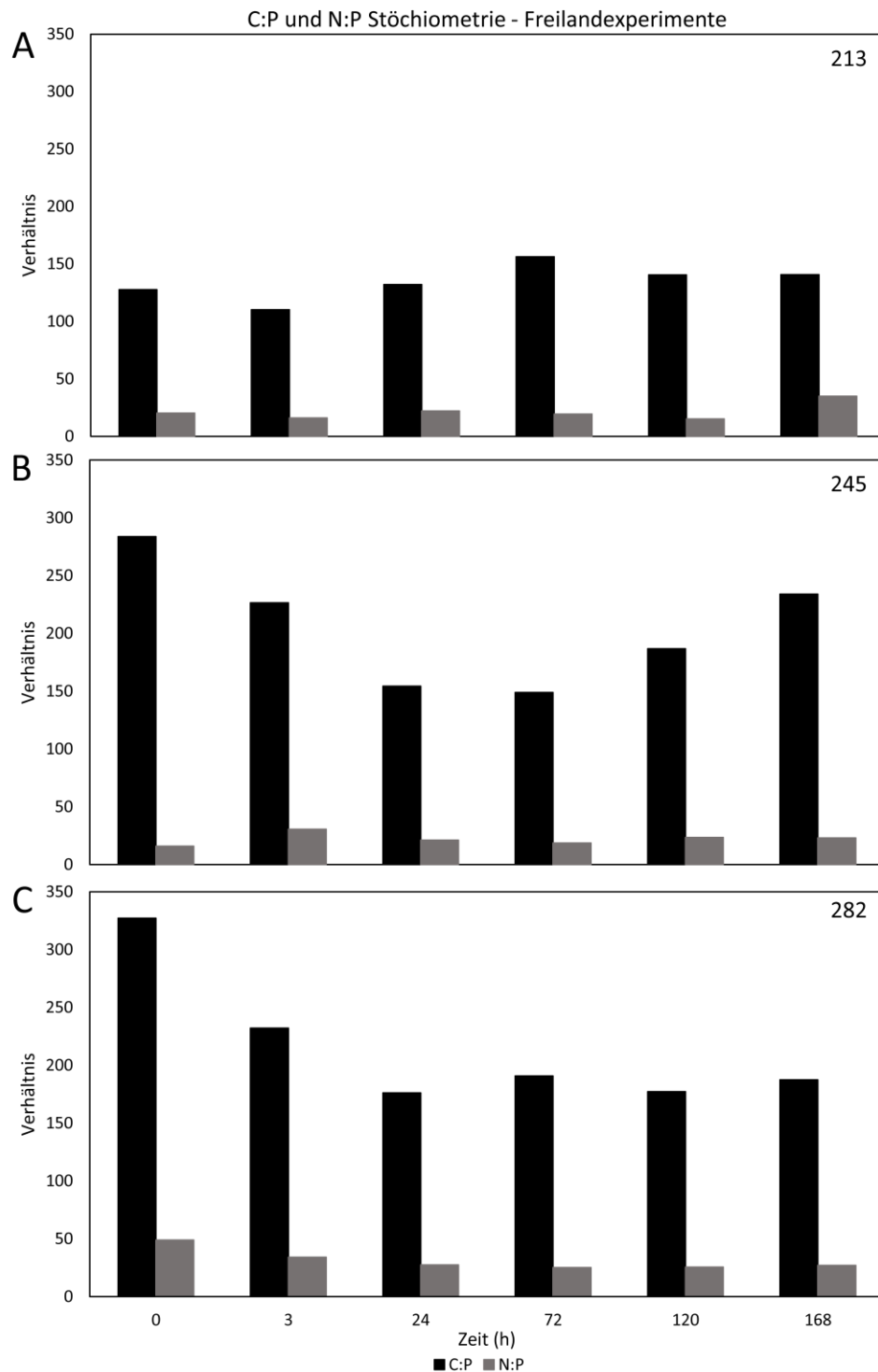


Abbildung 11) Veränderung der C:P und N:P Stöchiometrie über die Zeit in den Freilandexperimenten. A) Die Veränderung im Experiment an Station 213, in dem sich die Verhältnisse nur gering über den Untersuchungszeitraum änderten. B) Die Veränderung im Experiment an Station 245. Ein deutlicher Rückgang an C:P bis zur Mitte des Experiments ist zu erkennen, bevor das Verhältnis wieder ansteigt. C) Die Abnahme sowohl von C:P, als auch N:P im Experiment an Station 282.

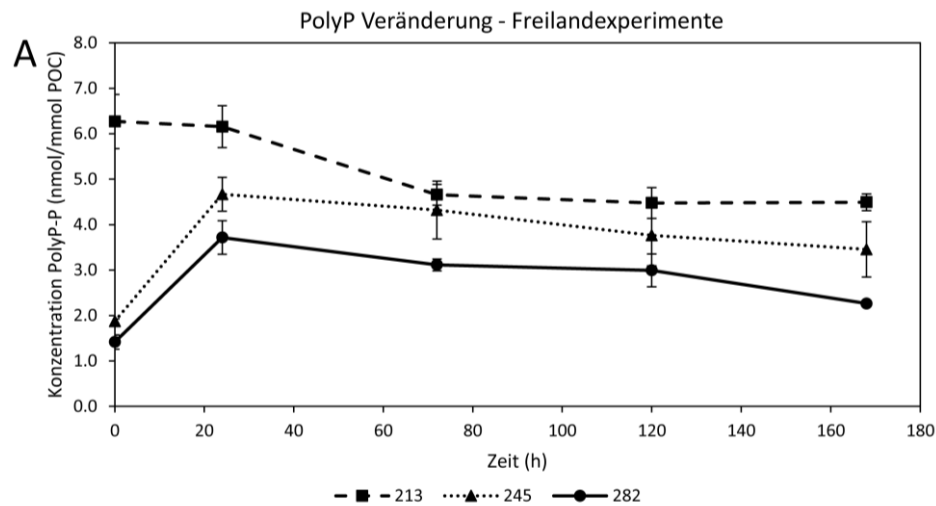


Abbildung 12) Veränderung des PolyP-Gehalts über die Zeit in den Freilandexperimenten. A) Die Veränderung in den drei Freilandexperimenten (schwarze Linien). Alle Werte sind auf PolyP-P berechnet und auf POC normalisiert.

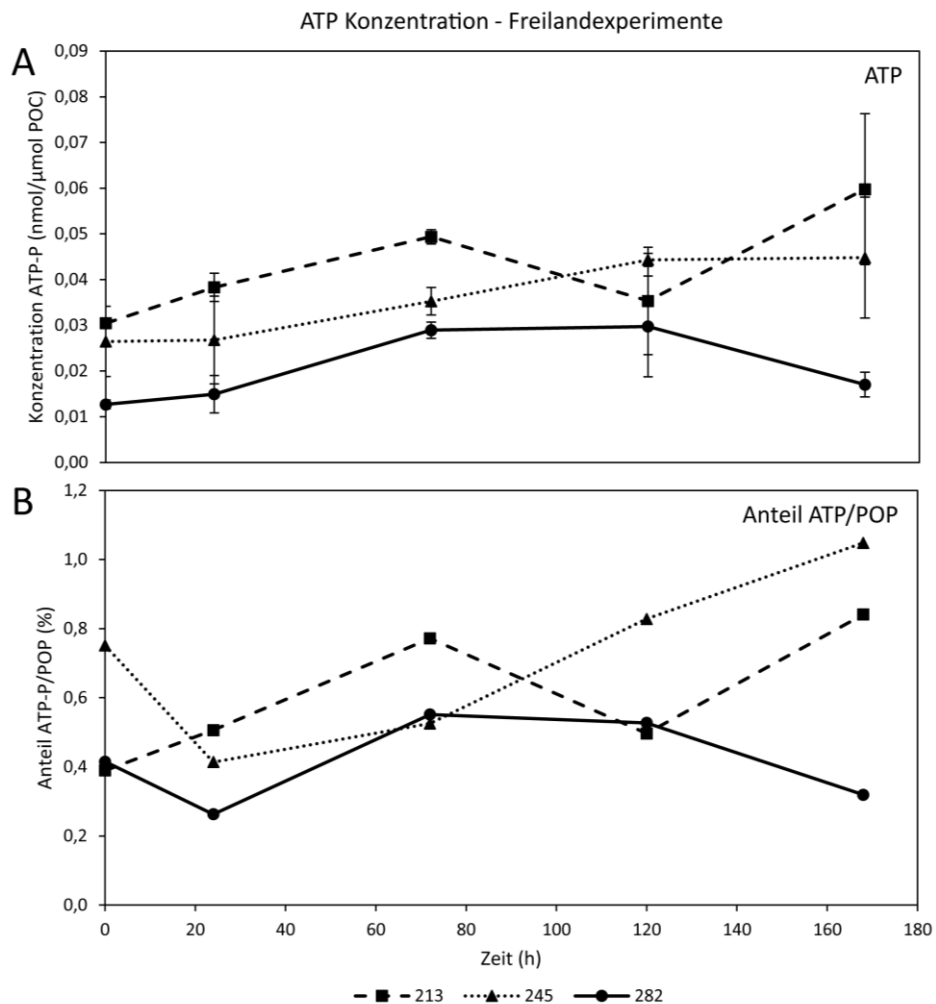


Abbildung 13) Veränderung des ATP-Gehalts über die Zeit in den Freilandexperimenten. A) Änderung im ATP-P Gehalt. In allen Experimenten kommt es innerhalb von 72 h zu einem Anstieg. B) Anteil von ATP-P am POP. An Station 245 und 282 kommt es innerhalb von 24 h zu einem Rückgang, bevor der Anteil wieder steigt. Der Anteil macht in allen Experimenten < 1 % aus.

Lipidzusammensetzung

Die Lipidzusammensetzungen an den einzelnen Stationen wichen nur geringfügig voneinander ab. In den Experimenten an Station 213 konnte eine Zunahme des Anteils der Lipidklasse von MGDG von 45 auf 50 % nach 24 h gemessen werden. Bis zum Ende des Experiments ging dieser Anteil auf 43 % zurück. DGDG hatte zu Beginn des Experiments einen Anteil von 15 % an den Gesamtlipiden. Dieser Anteil veränderte sich im Untersuchungszeitraum nur geringfügig. SQDG sank von 35 % innerhalb von 24 h auf 30 %, bevor der Anteil erneut auf 34 % nach 168 h zunahm. Der Anteil von PG nahm von 5 % bei Inkubationsstart bis auf 7 % am Ende des Experiments zu (Abbildung 14 A). Die 34:3 Gruppe war mit einem Anteil von 70 % am gesamten PG am stärksten vertreten. Eine Veränderung dieser Gruppe über den Experimentzeitraum konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 15 A).

Bei den Experimenten an Station 245 zeigte sich, dass MGDG zu jedem Zeitpunkt etwa 45 % der Lipidzusammensetzung ausmacht. DGDG lag konstant bei 17 % und SQDG bei 30 %. Für PG konnte ein Anteil von 7 - 8 % gemessen werden (Abbildung 14 B). Die Zusammensetzung der Fettsäuren von PG zeigte ebenfalls, dass die 34:3 Gruppe mit einem Anteil von 50 % die größte Gruppe ausmachte (Abbildung 15 B).

Die Änderung im Gehalt von MGDG, DGDG und SQDG waren bei den Experimenten an Station 282 ähnlich wie an Station 245. Der prozentuale Anteil von MGDG verringerte sich von 50 auf 43 %. Der Anteil von DGDG schwankte leicht um 17 % und der von SQDG um 28 - 30 %. Der Anteil von PG verdoppelte sich von 5 auf 10 % (Abbildung 14 C). In der Betrachtung der Fettsäurezusammensetzung von PG konnte in den ersten 120 h ein Rückgang der am stärksten vertretenen Gruppe (34:3) von 60 auf 35 % verzeichnet werden. Anschließend stieg der Gehalt dieser Fettsäurezusammensetzung wieder auf 43 %. Die anderen Fettsäurezusammensetzungen blieben während des gesamten Experiments auf dem gleichen Niveau, bis auf die 32:1 Gruppe, die von 5 auf 22 % innerhalb von 168 h zunahm und dann wieder auf 10 % abfiel (Abbildung 15 C).

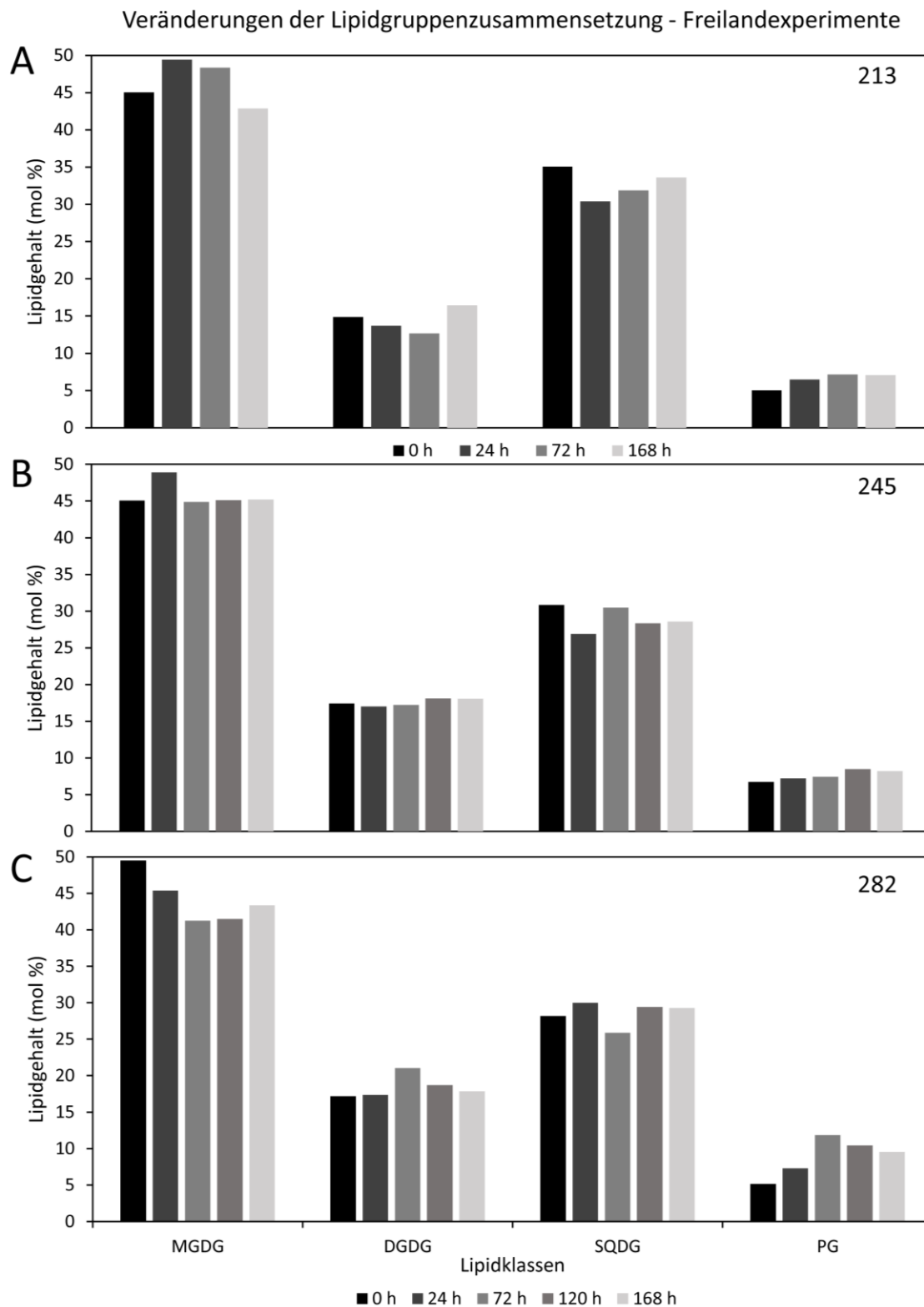


Abbildung 14) Veränderung der Lipidzusammensetzung über die Zeit in den Freilandexperimenten. In allen Experimenten machte MGDG den größten Anteil aus, gefolgt von SQDG und DGDG. PG stellte die kleinste Gruppe dar. A) Lipidzusammensetzung an Station 213. B) Lipidzusammensetzung an Station 245. C) Lipidzusammensetzung an Station 282. Im Gegensatz zu den anderen beiden Experimenten, konnte hier ein kleiner Zuwachs im PG gemessen werden.

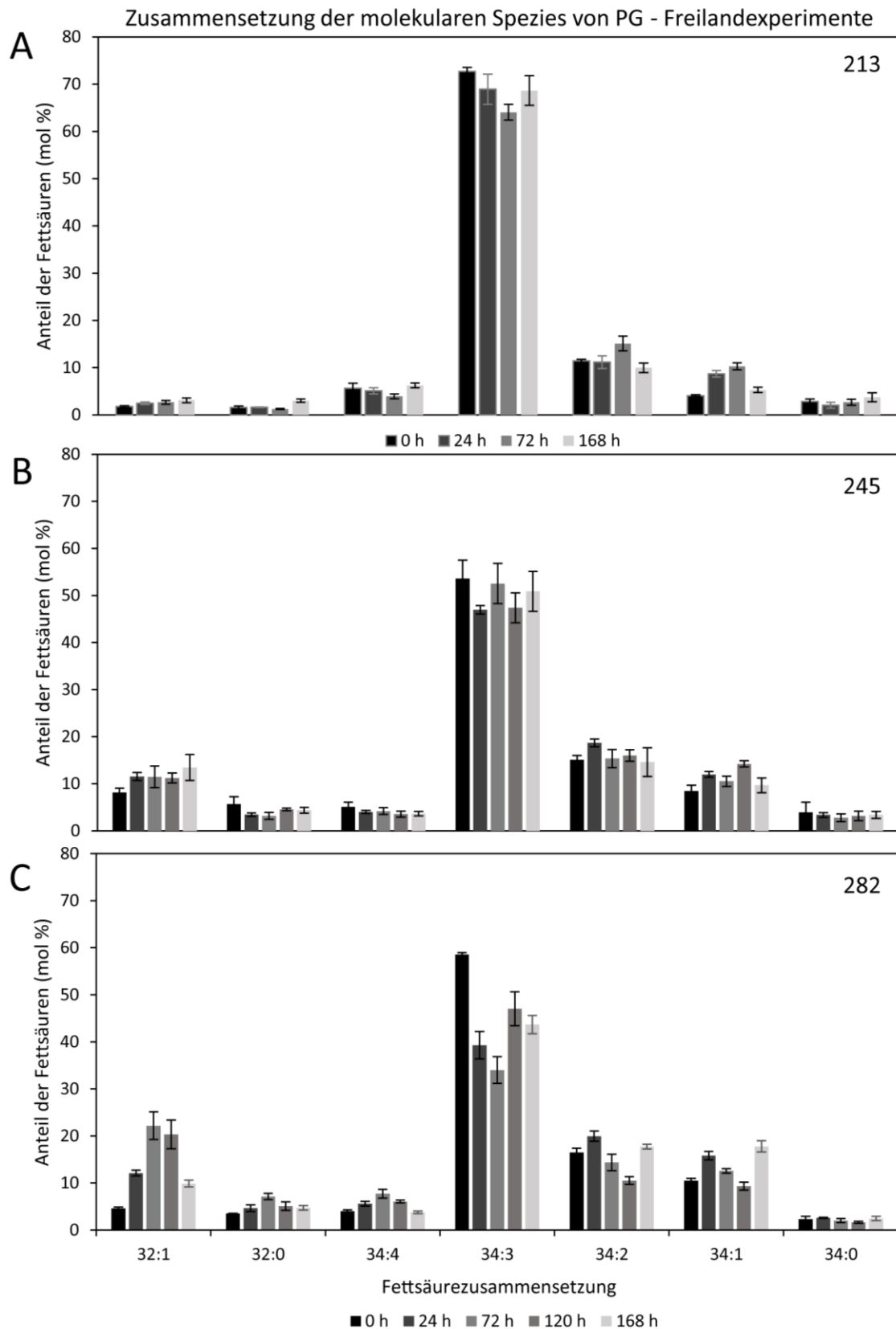


Abbildung 15) Veränderung der Fettsäurezusammensetzung der PG-Lipidklasse über die Zeit in den Freilandexperimenten. In allen Experimenten stellt die 34:3 Gruppe den größten Anteil an der Zusammensetzung von PG. A) Fettsäurezusammensetzung an Station 213. B) Fettsäurezusammensetzung an Station 245. C) Fettsäurezusammensetzung an Station 282. Hier konnte eine Abnahme der 34:3 Gruppe festgestellt werden.

Die Stickstofffixierung in den Freilandexperimenten

Die C:N Verhältnisse an den Stationen 245 und 282 waren mit Werten zwischen 6:1 und 7:1 recht ähnlich. Dieses Verhältnis änderte sich an Station 282 im Untersuchungszeitraum nicht. An Station 245 kam es zu einer leichten Erhöhung bis 10:1, ging dann aber bis zum Ende des Experiments auf 4:1 zurück. An Station 213 befanden sich die Cyanobakterien anfangs in einer Stickstofflimitation, was sich an einem C:N Verhältnis von 18:1 zeigt. Innerhalb von 24 h sank dieses Verhältnis auf 8:1 und änderte sich im weiteren Verlauf nur geringfügig (Abbildung 16 A).

Zu Beginn der Experimente war die Stickstofffixierungsrate an Station 213 etwa doppelt so hoch wie an Station 245 und extrem niedrig an Station 282. An Station 213 nahm die Stickstofffixierungsrate bis zum Ende des Experiments kontinuierlich von 0,47 auf 0,16 pmol/ μ mol POC h⁻¹ ab (Abbildung 16 B). Die Turnover-Zeit, welche angibt, welche Zeit benötigt wird um den zellulären Stickstoff durch fixierten Stickstoff zu ersetzen (berechnet nach Montoya *et al.*, 1996), stieg von 15 auf 42 Tage (Abbildung 16 C). An Station 245 stieg die Stickstofffixierungsrate von 0,21 pmol/ μ mol POC h⁻¹ kontinuierlich auf 0,43 pmol/ μ mol POC h⁻¹ nach einer Inkubationszeit von 168 h und blieb bis zum Ende des Experiments auf diesem Niveau. Die Turnover-Zeit verkürzte sich nach 168 h von 35 auf 25 Tagen. Zum Ende des Experiments nahm die die Turnover-Zeit wieder auf 47 Tage zu (Abbildung 16 C). An Station 282 stieg die Stickstofffixierungsrate innerhalb von 72 h von 0,05 auf 0,20 pmol/ μ mol POC h⁻¹ und nahm anschließend bis zum Ende des Experiments auf 0,15 pmol/ μ mol POC h⁻¹ ab (Abbildung 16 B). Die Turnover-Zeit verkürzte sich von 203 Tage auf 37 Tage (Abbildung 16 C).

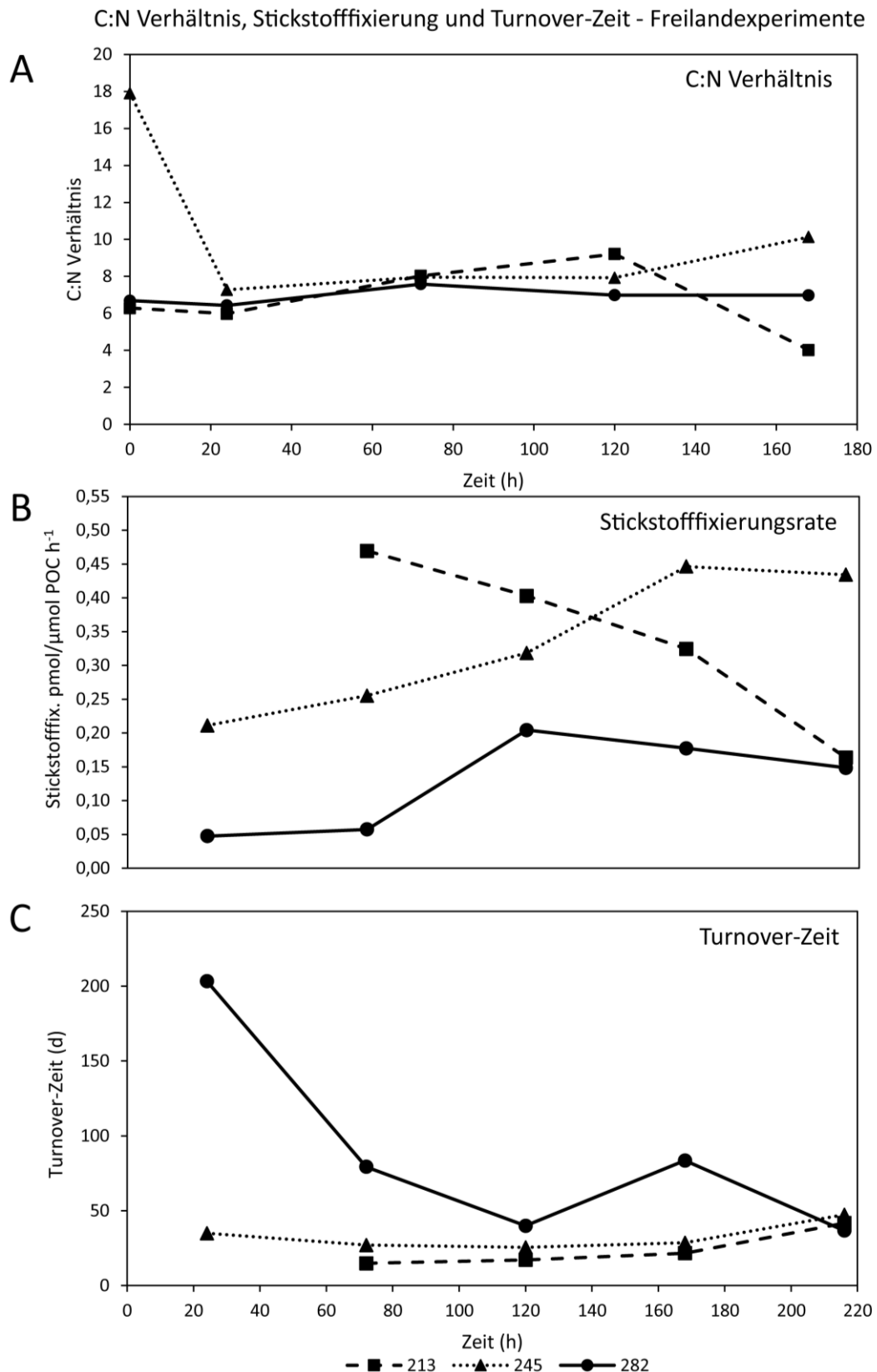


Abbildung 16) Veränderung des C:N Verhältnisses sowie Verlauf der Stickstofffixierungsrate und Turnover-Zeit für Stickstoff über die Zeit in den Freilandexperimenten. A) Die Veränderung im C:N Verhältnis. Die Cyanobakterien an Station 245 befanden sich im Stickstoffmangel. B) Die Veränderung der Stickstofffixierungsrate berechnet nach Montoya et al. (1996) und normalisiert auf POC. C) Die Veränderung in der Turnover-Zeit berechnet nach Montoya et al. (1996).

Untersuchungen der Phosphataufnahme bei einer *N. spumigena* CY9414 Kultur

Die aus den Freilandexperimenten gewonnenen Erkenntnisse für eine natürliche Cyanobakteriengemeinschaft, sollten unter Laborbedingungen an einer *N. spumigena* CY9414 Kultur validiert werden. Hierfür wurde derselbe experimentelle Aufbau wie in den Freilandexperimenten verwendet. Die Ausgangsbedingungen von *N. spumigena* CY9414 und die Inkubationsbedingungen waren in allen Experimenten sehr ähnlich, Unterschiede ergaben sich in der hinzugefügten Menge an Phosphat (Tabelle 13).

Tabelle 13) Die Ausgangskonzentration von Phosphat in den Laborexperimenten. Das Wasservolumen in den Inkubationsflaschen betrug $23,5 \pm 0,3$ L, so dass es zu Abweichungen zwischen der gemessenen Endkonzentration und der berechneten Phosphatzugabe kam.

Laborexperiment	1	2	3	Kontrolle
Phosphatkonzentration vor Zugabe ($\mu\text{mol/L}$)	0,13	0,07	0,06	0,04
Zugegebene Menge von Phosphat ($\mu\text{mol/L}$)	35,00	2,50	2,00	0,00
Endkonzentration bei t_0 ($\mu\text{mol/L}$)	34,87	2,73	2,14	0,04

Die Entwicklung der Phosphatkonzentration während der Laborexperimente

Vor Beginn der Inkubation und vor der Zugabe von Phosphat betrug die Phosphatkonzentration im Wasser im 1. Laborexperiment $0,13 \mu\text{mol/L}$, im 2. Laborexperiment $0,07 \mu\text{mol/L}$ und im 3. Laborexperiment $0,04 \mu\text{mol/L}$. Die Kontrolle hatte ebenfalls eine Ausgangskonzentration von $0,04 \mu\text{mol/L}$ Phosphat. Nach Zugabe vom Phosphat (Tabelle 13) ergaben sich eine Endkonzentration von $34,87 \mu\text{mol/L}$ (1. Laborexperiment), $2,73 \mu\text{mol/L}$ (2. Laborexperiment) und $2,14 \mu\text{mol/L}$ (3. Laborexperiment). Da bei der Kontrolle kein Phosphat hinzugefügt wurde, blieb die Konzentration unverändert bei $0,04 \mu\text{mol/L}$.

Im 1. Laborexperiment, welches eine Laufzeit von 360 h hatte, konnte in den ersten 24 h eine Abnahme der Phosphatkonzentration (DIP) auf $33,00 \pm 0,61 \mu\text{mol/L}$ gemessen werden. In den darauffolgenden 72 h blieb dieser Wert konstant, bevor er nach 216 h auf $31,87 \pm 0,64 \mu\text{mol/L}$ sank und auf diesem Niveau blieb. Erst nach 312 h sank die Phosphatkonzentration weiter und erreichte einen Wert von $20,87 \pm 0,34 \mu\text{mol/L}$ am Ende der Inkubationszeit (Abbildung 18 A). Im 2. Laborexperiment nahm die Phosphatkonzentration in den ersten 24 h um 25 % auf $2,08 \pm 0,10 \mu\text{mol/L}$ ab. Danach sank die Konzentration

kontinuierlich weiter und erreichte am Ende der Inkubation einen Wert von $0,61 \pm 0,64 \mu\text{mol/L}$ (Abbildung 18 B). Im 3. Laborexperiment sank die Phosphatkonzentration innerhalb von 24 h um die Hälfte auf $1,03 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$. Im weiteren Verlauf des Experiments nahm die Phosphatkonzentration bis auf $0,38 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ ab (Abbildung 18 C). In der Kontrolle lag die Phosphatkonzentration geringfügig über der Nachweisgrenze (Abbildung 18 D).

Die Entwicklung der Biomasse gemessen am POC, PON und dem Chlorophyllgehalt

Die *Nodularia*-Biomasse im 1. Laborexperiment nahm von einem Ausgangsniveau von $61,78 \pm 10,91 \mu\text{mol C/L}$ kontinuierlich zu und erreichte nach 360 h eine Konzentration von $259,11 \pm 22,86 \mu\text{mol C/L}$. Dies entsprach einem Zuwachs von 319 %. Im 2. Laborexperiment konnte ebenfalls ein Zuwachs der Biomasse, von Beginn des Experiments an, verzeichnet werden. Der Ausgangswert von $48,47 \pm 4,61 \mu\text{mol C/L}$ stieg kontinuierlich auf $140,68 \pm 12,97 \mu\text{mol C/L}$ nach 216 h an. Dies entsprach einem Zuwachs von 118 %. Im 3. Laborexperiment stieg die Biomasse von einer Ausgangskonzentration von $57,54 \pm 3,81 \mu\text{mol C/L}$ um 79 %, auf $103,18 \mu\text{mol C/L}$. In der Kontrolle konnte ebenfalls ein Wachstum von 65,44 auf $113,20 \mu\text{mol C/L}$ nach 216 h beobachtet werden (Abbildung 17 A).

Die Konzentration an PON nahm bis zum Ende des 1. Laborexperiments von $7,72 \pm 0,84$ auf $37,41 \pm 6,94 \mu\text{mol N/L}$ zu. Dies entsprach einem Zuwachs von 385 %. Im 2. Laborexperiment nahm PON von Beginn bis zum Ende des Experiments kontinuierlich zu, wobei sich die Konzentration von $3,21 \pm 0,51 \mu\text{mol N/L}$ um 606 % auf $22,65 \pm 1,95 \mu\text{mol N/L}$ nach 216 h erhöhte. Eine Zunahme von PON konnte ebenfalls im 3. Laborexperiment beobachtet werden. Hier stieg der Wert von $7,12 \pm 0,39$ auf $15,57 \pm 0,78 \mu\text{mol N/L}$ nach 168 h. Die Kontrolle zeigte eine Erhöhung von 7,56 auf $17,74 \mu\text{mol N/L}$ nach 216 h (Abbildung 17 B).

Im 1. Laborexperiment veränderte sich der Chlorophyll a-Gehalt nur geringfügig und blieb um $0,14 \pm 0,03 \text{ nmol}/\mu\text{mol POC}$. Im 2. Laborexperiment nahm der Chlorophyll a-Gehalt von $0,19 \pm 0,02 \text{ nmol}/\mu\text{mol POC}$ innerhalb von 72 h auf $0,13 \pm 0,01 \text{ nmol}/\mu\text{mol POC}$ ab. Bis zum Ende des Experiments stieg der Gehalt jedoch wieder auf $0,18 \pm 0,01 \text{ nmol}/\mu\text{mol POC}$. Der Chlorophyll a-Gehalt im 3. Experiment nahm in den ersten 72 h ebenfalls ab und stieg dann wieder auf den Ausgangswert von $0,12 \pm 0,02 \text{ nmol}/\mu\text{mol POC}$. Die Kontrolle zeigte keine großen Veränderungen hinsichtlich des Chlorophyll a-Gehalts (Abbildung 17 C).

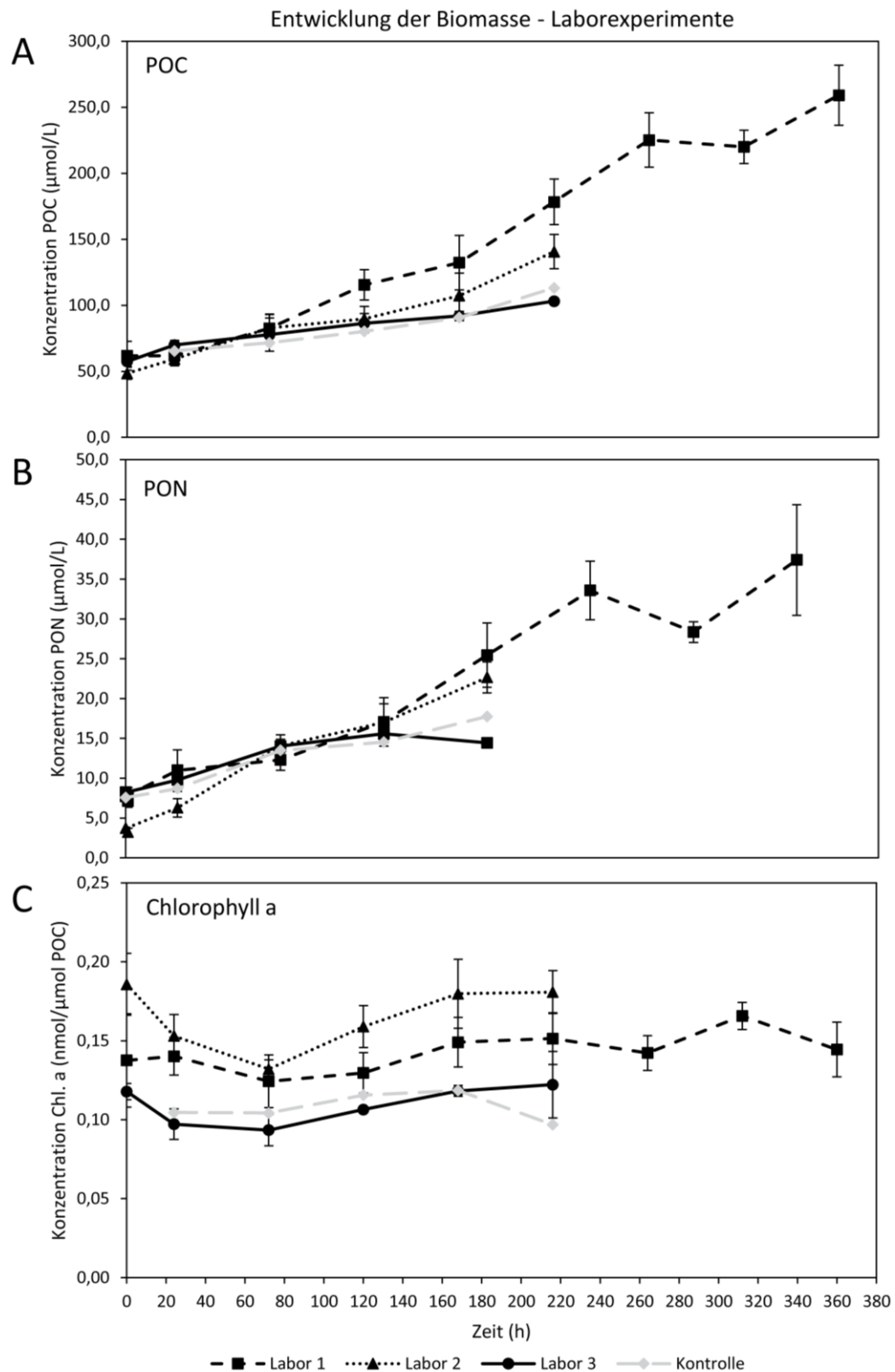


Abbildung 17) Veränderung der Biomasse über die Zeit in den Laborexperimenten. A: Die Veränderung der POC-Konzentration. B) Die Veränderung PON-Konzentration C): Die Veränderung des Chlorophyll a-Konzentration, welche auf $\mu\text{mol POC}$ normalisiert wurde. Die Standardabweichung konnte für den letzten Messpunkt im 3. Laborexperiment aufgrund von $n = 2$ für POC und PON, nicht angegeben werden.

Die Änderungen der Phosphorfraktionen

Im 1. Laborexperiment blieb die TP-Konzentration an den einzelnen Zeitpunkten relativ konstant bei einem Wert von $65,37 \pm 0,47 \mu\text{mol/L}$. Die DOP-Konzentration änderte sich innerhalb von 264 h kaum ($29,50 \pm 0,76 \mu\text{mol/L}$), dann erfolgte eine Zunahme auf $34,40 \pm 1,18 \mu\text{mol/L}$. Die POP-Konzentration stieg von einem Ausgangswert von $1,10 \pm 1,00 \mu\text{mol P/L}$ um 817 % auf $10,09 \pm 2,15 \mu\text{mol P/L}$ nach 360 h, wobei der stärkste Zuwachs im Zeitraum zwischen 216 h und 360 h gemessen wurde (Abbildung 18 A). Im 2. Laborexperiment betrug die TP-Konzentration über die gesamte Versuchsdauer $3,10 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$. Die DOP-Konzentration betrug $0,08 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$ und blieb während des Experiments konstant. Der POP-Ausgangswert von $0,53 \pm 0,14 \mu\text{mol P/L}$ stieg während der gesamten Inkubationszeit um 328 % auf $2,27 \pm 0,44 \mu\text{mol P/L}$ (Abbildung 18 B). Das 3. Laborexperiment zeigte ebenfalls nur eine geringfügige Änderung der TP-Konzentration über die Zeit ($2,54 \pm 0,10 \mu\text{mol/L}$). Die DOP-Konzentration nahm im Experimentierzeitraum um 300 % von $0,05 \pm 0,03$ auf $0,20 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$ zu. Die POP-Konzentration stieg innerhalb von 24 h von $0,46 \pm 0,04 \mu\text{mol P/L}$ um 213 % auf $1,44 \pm 0,09 \mu\text{mol P/L}$. Danach stieg die POP-Konzentration weiter an, jedoch nicht mehr so stark wie in den ersten 24 h (Abbildung 18 C). Die Kontrolle zeigte, dass die TP-Konzentration über den Experimentierzeitraum weitestgehend stabil bei $0,51 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$ lag. Die DOP-Konzentration stieg von $0,12 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$ um 75% und betrug am Ende des Experiments $0,21 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$. Jedoch schwankte dieser Wert von Messpunkt zu Messpunkt, so dass keine kontinuierliche Zunahme beobachtet werden konnte. Die POP-Konzentration stieg innerhalb von 24 h von 0,31 auf $0,42 \mu\text{mol P/L}$. Anschließend kam es zu einem allmählichen Rückgang bis zum Ende des Experiments auf $0,32 \mu\text{mol P/L}$, was dem Ausgangswert entsprach (Abbildung 18 C).

Veränderungen der C:P und N:P Stöchiometrie

Das C:P Verhältnis im 1. Laborexperiment schwankte stetig im Laufe des Experiments, nahm jedoch von Beginn bis zum Ende um 54 % ab. Das N:P Verhältnis blieb weitestgehend im selben Verhältnis und es konnten nur leichte Unterschiede gemessen werden (Abbildung 20 A). Im 2. Laborexperiment kam es zu einer Gesamtabnahme des C:P Verhältnis von 32 %, wobei der stärkste Rückgang innerhalb der ersten 24 h beobachtet wurde. Das N:P Verhältnis stieg von 6:1 auf 10:1 leicht an (Abbildung 20 B). Im 3. Laborexperiment konnte in den ersten 24 h ein Rückgang des C:P Verhältnisses um 62 %

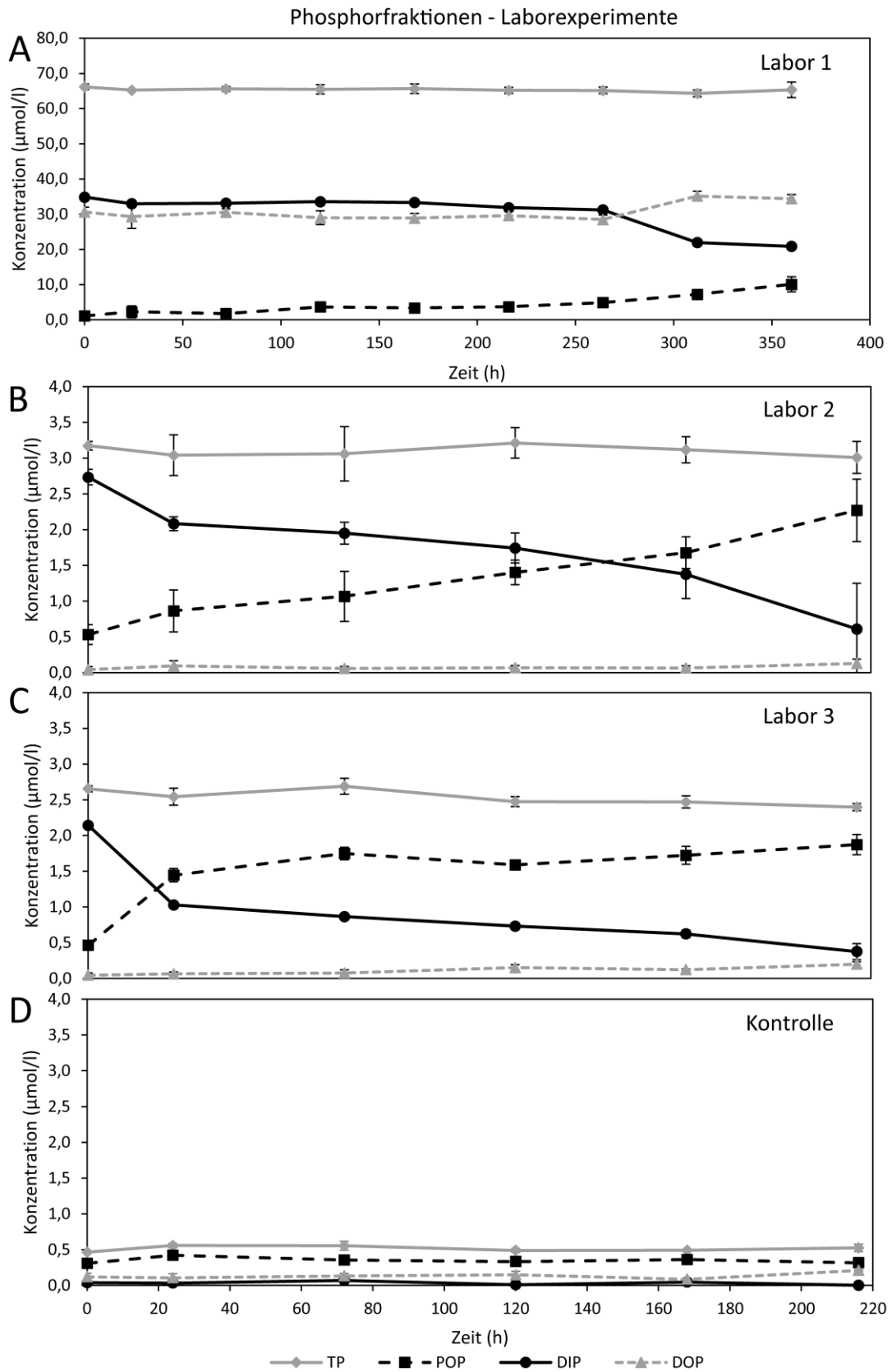


Abbildung 18) Veränderung der Konzentrationen der Phosphorfraktionen über die Zeit in den Labor-experimenten. A) Der Verlauf im 1. Laborexperiment, in dem es nur an den letzten beiden Messzeitpunkten zu einer Änderung kam. B) Die Veränderung im 2. Laborexperiment. C) Die Veränderung im 3. Laborexperiment. D) Der Verlauf in der Kontrolle, in der es zu keinen Änderungen kam.

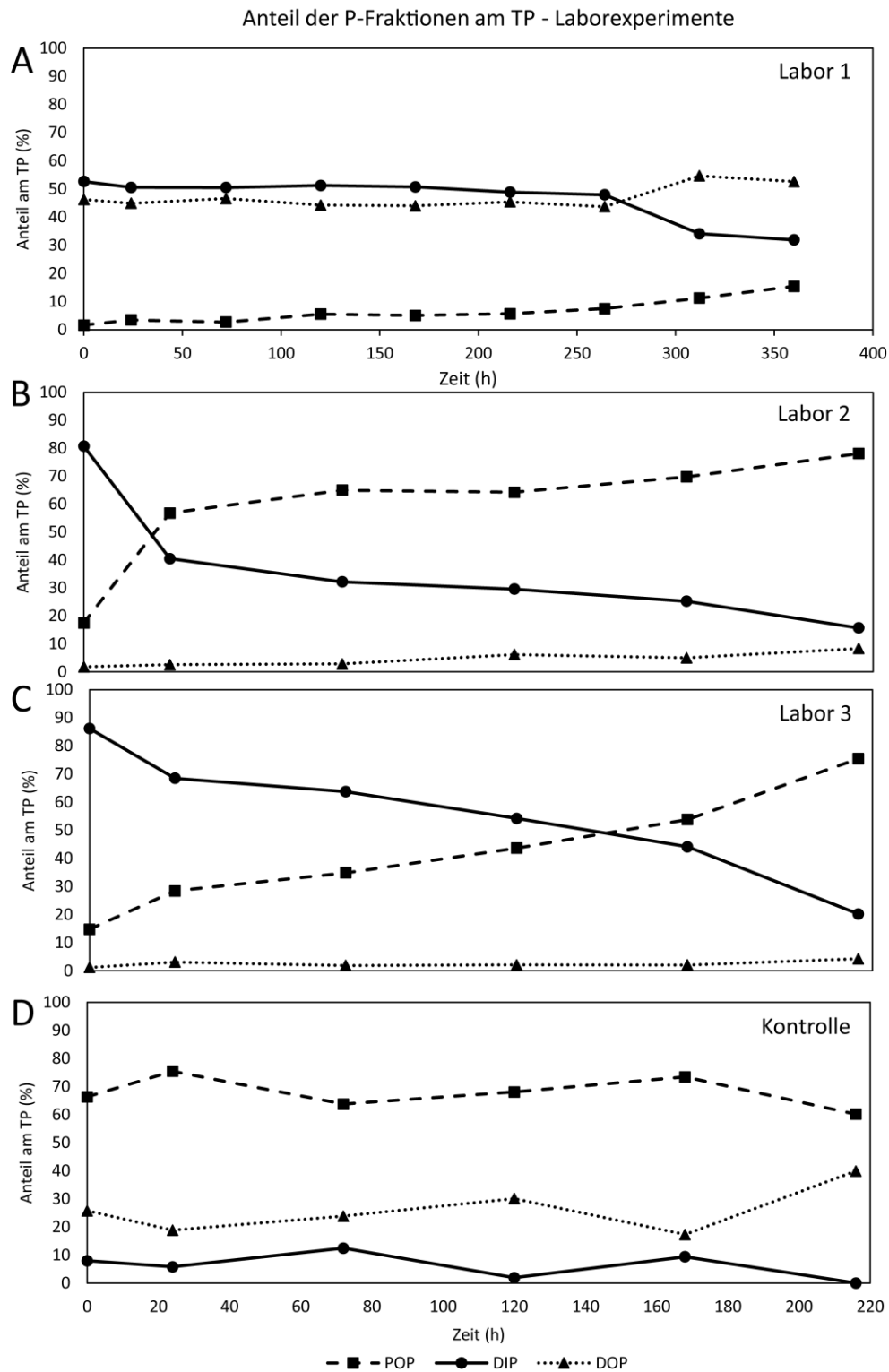


Abbildung 19) Veränderung der Phosphorfractionen über die Zeit in den Laborexperimenten. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der einzelnen Fractionen gemessen am TP. A) Der Verlauf im 1. Laborexperiment, in dem es nur an den letzten beiden Messzeitpunkten zu Änderungen kam. Dieses Experiment wurde länger als die darauffolgenden Laborexperimente durchgeführt. B) Die Veränderung im 2. Laborexperiment. C) Die Veränderung im 3. Laborexperiment. D) Der Verlauf in der Kontrolle, in der es zu keinen großen Änderungen kam. Die gemessenen Werte schwankten um die Ausgangswerte. Den größten Anteil machte DOP aus, da in der Kontrolle den Cyanobakterien kein DIP zur Verfügung stand.

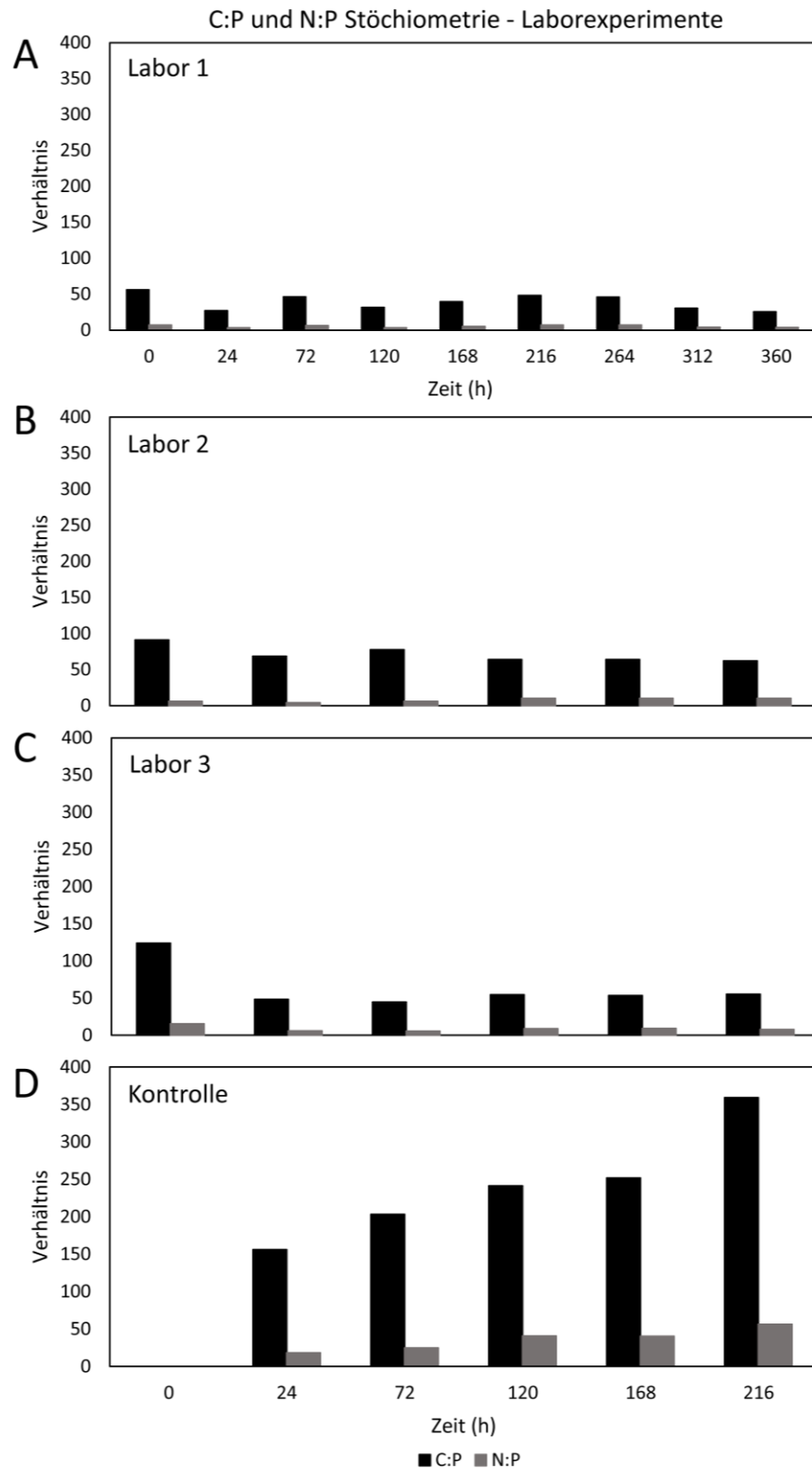


Abbildung 20) Veränderung der C:P und N:P Stöchiometrie über die Zeit in den Laborexperimenten. A) Die Veränderung im 1. Laborexperiment, in dem sich die Verhältnisse nur gering über den Untersuchungszeitraum änderten. Dieses Experiment hatte eine längere Laufzeit als die anderen Laborexperimente. B) Die Veränderung im 2. Laborexperiment. Eine geringe Abnahme an C:P ist zu erkennen. C) Die Abnahme von C:P in den ersten 24 h ist deutlich zu erkennen. D) In der Kontrolle nimmt sowohl das C:P, als auch das N:P Verhältnis stark zu. Für t_0 konnten keine Ergebnisse erzielt werden.

gemessen werden. Im weiteren Verlauf des Experiments änderte sich dieses Verhältnis nur noch geringfügig. Das N:P Verhältnis änderte sich ebenfalls in den ersten 24 h am stärksten (- 60 %; Abbildung 20 C). Der Ausgangswert der Kontrolle konnte aufgrund fehlerhafter Messung nicht mit aufgenommen werden. Im weiteren Verlauf des Experiments zeigte sich jedoch eine Erhöhung des C:P Verhältnisses um 130 %. Das N:P Verhältnis stieg ebenfalls im Laufe des Experiments um 211 % (Abbildung 20 D).

Veränderungen der phosphorreichen Zellkomponenten PolyP und ATP sowie der Lipidzusammensetzung

Polyphosphat-Gehalt

Im 1. Laborexperiment stieg der PolyP-Gehalt innerhalb von 24 h um 538 % von $8,82 \pm 2,01$ auf $56,30 \pm 2,80$ nmol/ μ mol POC (Abbildung 21 A). Dieser rapide Anstieg konnte im 3-Stunden-Intervall genauer nachvollzogen werden (Abbildung 21 B). Nach 24 h sank der PolyP-Gehalt wieder und erreichte nach einer Inkubationszeit von 216 h einen Wert von $21,46 \pm 3,11$ nmol/ μ mol POC und blieb bis zum Ende der Inkubationszeit nach 360 h konstant um diesen Wert. Der Endwert lag um 183 % höher als der Ausgangswert (Abbildung 21 A). Im 2. Experiment konnte ein Ausgangswert von $11,35 \pm 1,38$ nmol/ μ mol POC gemessen werden. Dieser nahm um 114 % in 24 h auf $24,33 \pm 4,63$ nmol/ μ mol POC zu. Die PolyP-Gehalt ging auf $17,87 \pm 3,01$ nmol/ μ mol POC nach 72 h zurück und blieb bis zum Ende des Experiments auf diesem Level (Abbildung 21 A). Im 3. Laborexperiment stieg der Ausgangswert von $10,14 \pm 2,03$ nmol/ μ mol POC kontinuierlich innerhalb von 24 h auf $29,57 \pm 0,47$ nmol/ μ mol POC, was einem Zuwachs von 192 % entsprach. Bis zum Zeitpunkt bei 168 h konnte dann eine Abnahme dieses Wertes auf $23,51 \pm 4,38$ nmol/ μ mol POC gemessen werden und änderte sich bis zum Ende des Experiments nicht. Die PolyP Messung im 3-Stunden-Intervall in den ersten 24 h zeigte in der Kontrolle keine signifikante Änderung (Abbildung 21 B). Nach 24 h ging der Gehalt kontinuierlich zurück. Nach 220 h wurde ein Wert von 1,95 nmol/ μ mol POC gemessen, welcher 63 % niedriger war, als der Wert bei 24 h (Abbildung 21 A).

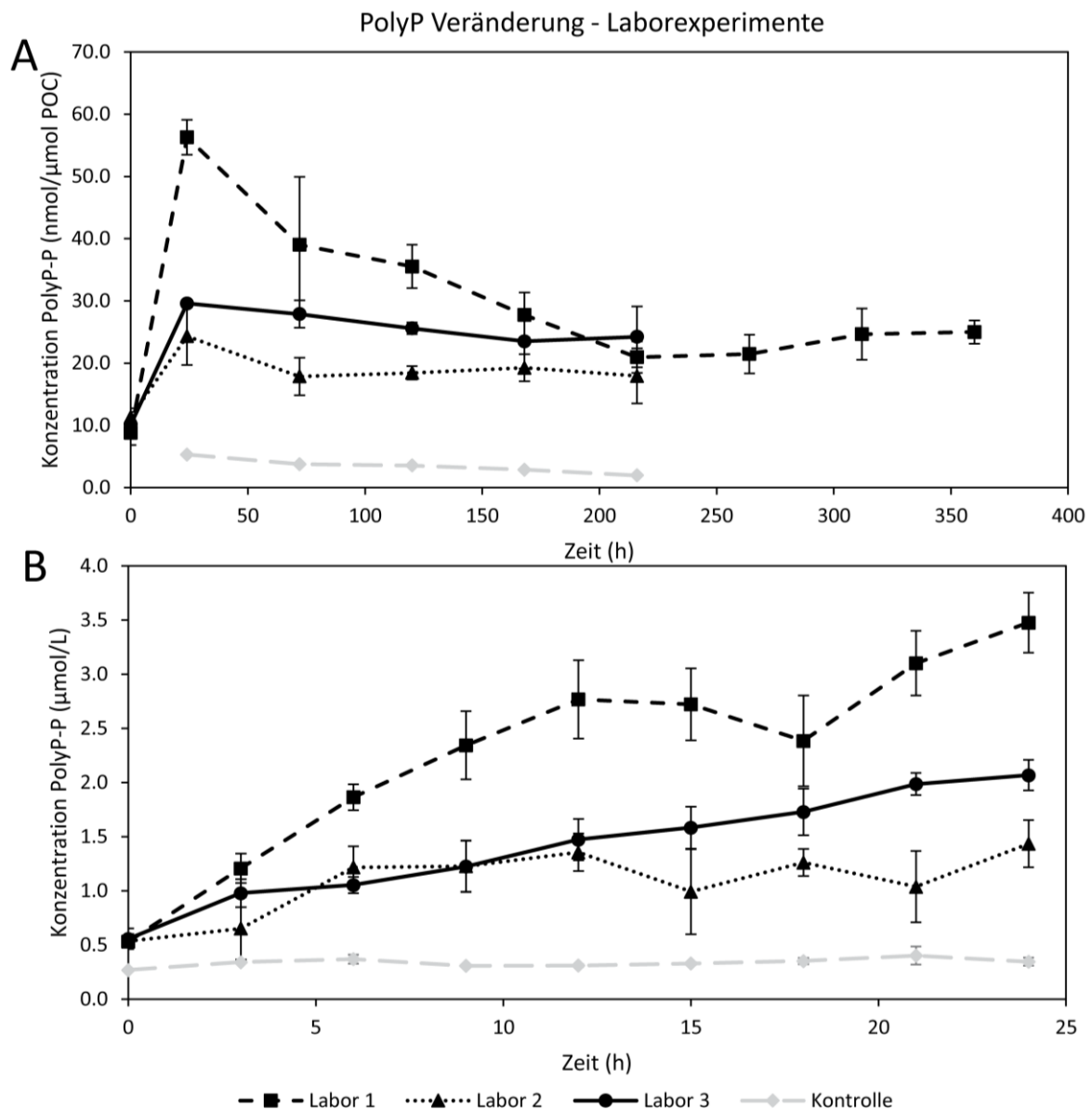


Abbildung 21) Veränderung des PolyP-Gehalts über die Zeit in den Laborexperimenten. A) Die Veränderung in den drei Experimenten (schwarze Linien) sowie in der Kontrolle (graue Linie) über die gesamte Laufzeit der Experimente. Alle Werte sind auf PolyP-P berechnet und auf POC normalisiert. Eine deutliche Zunahme ist in den drei Laborexperimenten in den ersten 24 h zu erkennen. Für die Kontrolle konnte kein Ausgangswert ermittelt werden. B) Die Veränderung in den drei Experimenten (schwarze Linien) sowie in der Kontrolle (graue Linie) gemessen im 3-Stunden-Intervall in den ersten 24 h als PolyP-P. Die Werte sind in $\mu\text{mol/L}$ angegeben, da durch fehlende POC Werte diese nicht normalisiert werden konnten. In allen Laborexperimenten zeigt sich eine Zunahme, jedoch nicht in der Kontrolle.

ATP-Gehalt

In den ersten 72 h des 1. Laborexperiments sank der ATP-Gehalt von $0,014 \pm 0,004$ auf $0,011 \pm 0,001$ nmol ATP-P/ μmol POC. In den darauffolgenden 96 h stieg der ATP-Gehalt wieder um 73 % auf $0,019 \pm 0,001$ nmol ATP-P/ μmol POC. Zum Ende des Experiments nahm der Gehalt erneut ab und es konnte noch nach 360 h $0,011 \pm 0,001$ nmol ATP-P/ μmol POC gemessen werden. Im 2. Laborexperiment nahm der ATP-Gehalt innerhalb von 120 h von

$0,027 \pm 0,004$ auf $0,020 \pm 0,005$ nmol ATP-P/ μ mol POC ab. Der Gehalt stieg anschließend nochmal auf $0,027 \pm 0,002$ nmol ATP-P/ μ mol POC. Im 3. Laborexperiment nahm der Gehalt in 24 h um 58 % von $0,012 \pm 0,001$ auf $0,005 \pm 0,002$ nmol ATP-P/ μ mol POC ab und stieg anschließend bis zum Ende des Experiments leicht an. In der Kontrolle nahm der Gehalt an ATP über den Zeitraum von $0,019$ nmol ATP-P/ μ mol POC um ca. 84 % auf $0,003$ nmol ATP-P/ μ mol POC ab (Abbildung 22 A).

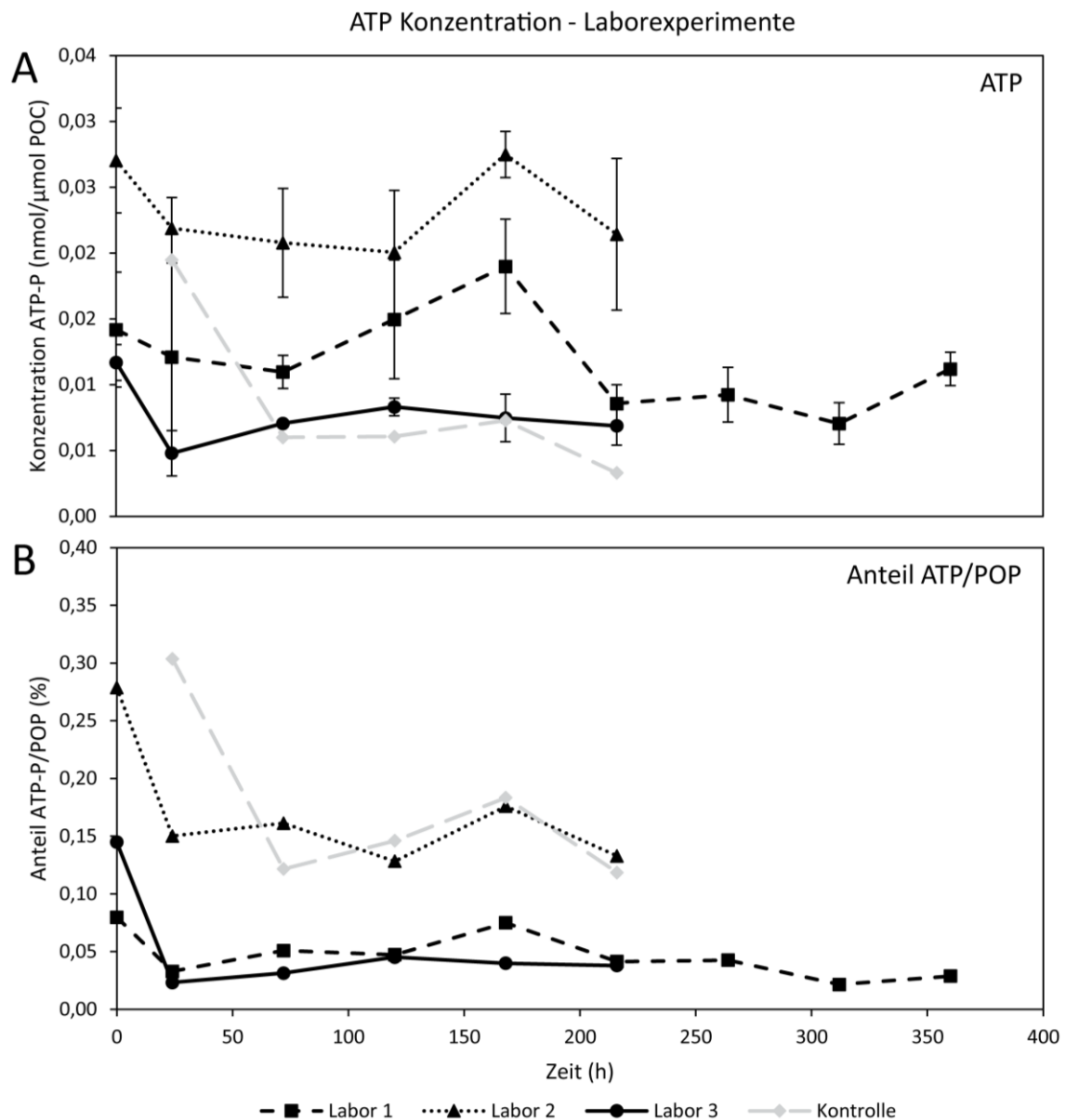


Abbildung 22) Veränderung des ATP-Gehalts über die Zeit in den drei Laborexperimenten und in der Kontrolle. A) Änderung des ATP-P-Gehalts. In allen Experimenten und der Kontrolle kommt innerhalb von 72 h zu einem Rückgang. B) Anteil von ATP-P am POP. In allen Experimenten nimmt der Anteil innerhalb von 24 h ab, bevor der Anteil wieder leicht steigt. Der Anteil macht in allen Experimenten < 0,5 % aus.

Lipidzusammensetzung

In allen Experimenten konnten die Lipidgruppen MGDG, DGDG, SQDG und PG nachgewiesen werden. Die Phospholipidgruppen PA, PS, PI, PE und PC waren unterhalb der Nachweisgrenze. Im 1. Laborexperiment zeigte die prozentuale Verteilung der Lipidgruppen einen Rückgang von 65 auf 59 % bei MGDG. DGDG nahm von 11 auf 6 % nach 168 h ab, bevor der Anteil wieder auf 10 % stieg. Der Anteil von SQDG stieg von 19 auf 23 % und PG nahm von 4 auf 7 % zu (Abbildung 23 A). Die Fettsäurezusammensetzung von PG zeigte eine Zunahme der 34:3 Gruppe von 30 auf 65 %, während ein Rückgang der 34:1 Gruppe von 40 auf 17 % zu beobachten war. In der 34:2 Gruppe kam es nur zu geringen Änderungen und am Ende war der Ausgangsanteil von 16 % wieder erreicht (Abbildung 24 A). Im 2. Laborexperiment lag der prozentuale Anteil von MGDG während des gesamten Experiments bei 65 %, DGDG bei 8 %, SQDG bei 18 % und PG bei 7 % (Abbildung 23 B). Die Zusammensetzung der Fettsäuren von PG zeigte eine Zunahme der 34:3 Gruppe von anfänglichen 24 auf 60 % am Ende des Experiments. Der Anteil der 34:1 Gruppe sank in diesem Zeitraum von 48 auf 22 % (Abbildung 24 B). MGDG machte im 3. Laborexperiment einen Anteil von 63 % an den Gesamtlipiden aus. DGDG lag bei 10 % und bei SQDG konnte ein leichter Rückgang von 21 auf 17 % beobachtet werden. Der Anteil an PG nahm hingegen von 3 auf 6 % leicht zu (Abbildung 23 C). Die Betrachtung der Fettsäurezusammensetzung von PG zeigte eine Zunahme der 34:3 Gruppe von 13 auf 48 %. Die 34:1 Gruppe nahm hingegen von 68 auf 32 % ab. Eine leichte Veränderung konnte auch in der 34:2 Gruppe beobachtet werden, die von 16 auf 13 % sank (Abbildung 24 C). In der Kontrolle machte MGDG 58 % der Lipidzusammensetzung aus, DGDG lag bei 10 %, SQDG lag bei 20 % und PG lag bei 5 %. Der Anteil der 34:3 Gruppe bei PG stieg von 38 auf 48 %, wohingegen die 34:1 Gruppe von 35 auf 25 % abnahm.

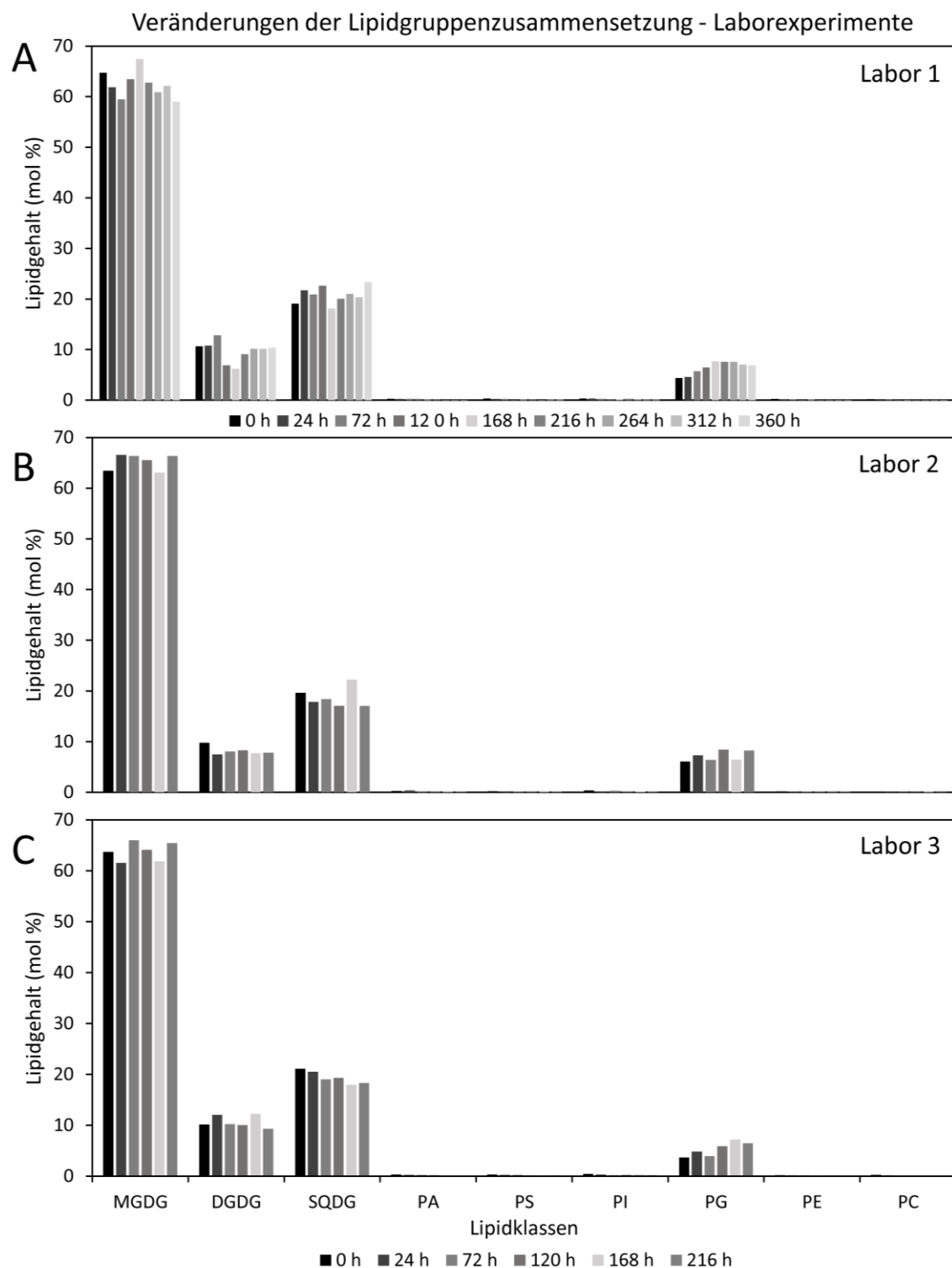


Abbildung 23) Veränderung der Lipidzusammensetzung über die Zeit in den Laborexperimenten. In allen Experimenten machte MGDG den größten Anteil aus, gefolgt von SQDG und DGDG. PG stellte die kleinste Gruppe dar. Die Lipidgruppen PA, PS, PI, PE und PC konnten nicht nachgewiesen werden. A) Lipidzusammensetzung im 1. Laborexperiment. B) Lipidzusammensetzung im 2. Laborexperiment. C) Lipidzusammensetzung im 3. Laborexperiment.

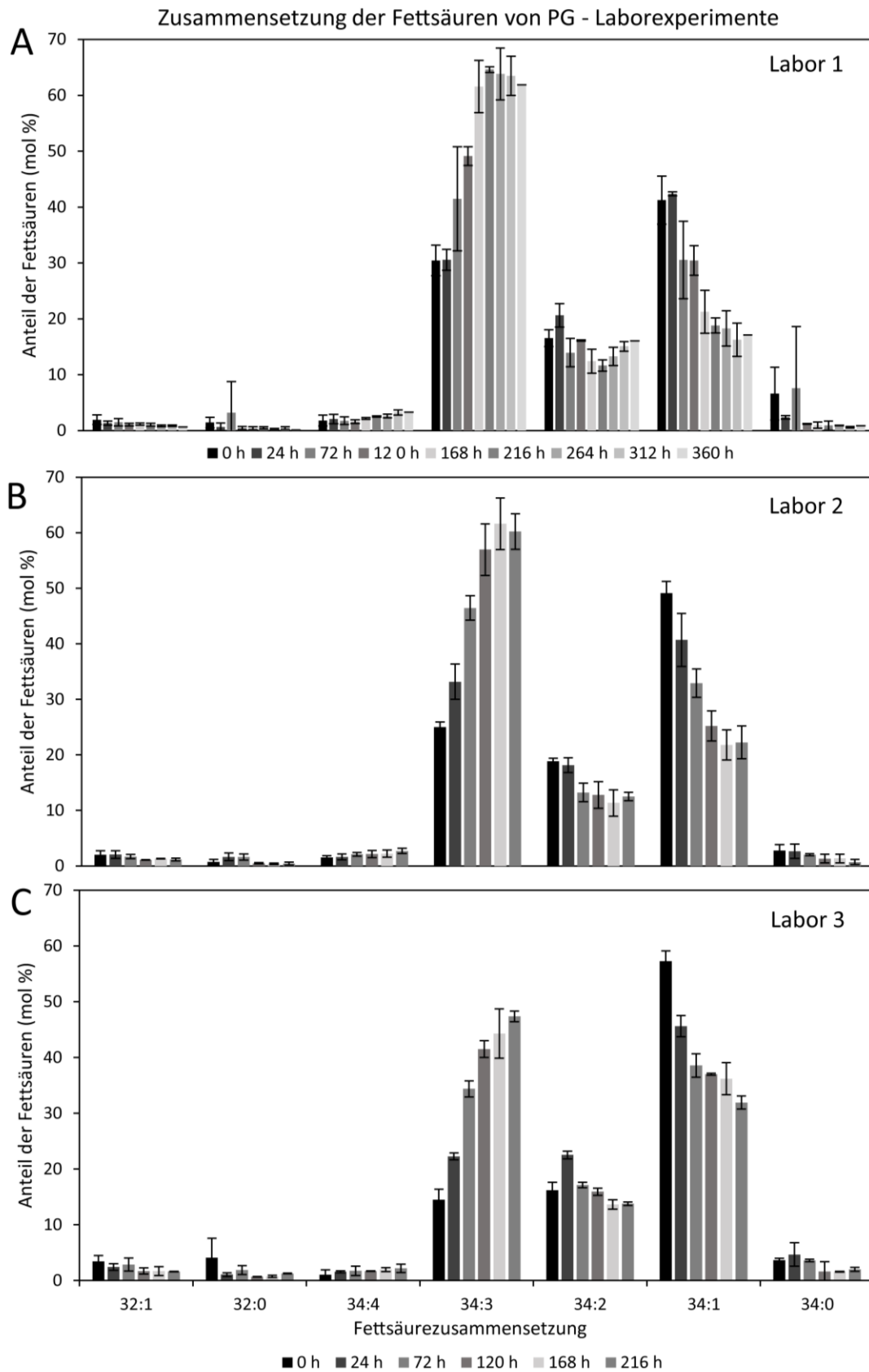


Abbildung 24) Veränderung der Fettsäurezusammensetzung der PG-Lipidklasse über die Zeit in den Laborexperimenten. In allen Experimenten konnte eine Zunahme der 34:3 Gruppe bei gleichzeitigem Rückgang der 34:1 Gruppe festgestellt werden. Diese beiden Gruppen, stellten die die größten Gruppen dar, gefolgt von der 34:2 Gruppe A) Fettsäurezusammensetzung im 1. Laborexperiment. B) Fettsäurezusammensetzung im 2. Laborexperiment C) Fettsäurezusammensetzung im 3. Laborexperiment

Die Stickstofffixierung in den Laborexperimenten

Im 1. Laborexperiment nahm die Stickstofffixierungsrate innerhalb von 264 h von 0,20 auf 0,58 pmol/ μ mol POC h⁻¹ zu. Zum Ende des Experiments sank sie auf 0,31 pmol/ μ mol POC h⁻¹. Die Turnover-Zeit verkürzte sich von 35 Tage beim Messpunkt 24 h bis auf 16 Tage (Messpunkt 360 h). Am Ende des Experiments wurde eine Turnover-Zeit von 31 Tagen gemessen. Im 2. Laborexperiment stieg die Stickstofffixierungsrate innerhalb von 120 h von 0,12 auf 0,42 pmol/ μ mol POC h⁻¹. Anschließend nahm sie bis auf 0,10 pmol/ μ mol POC h⁻¹ ab, bevor sie erneut auf 0,49 pmol/ μ mol POC h⁻¹ anstieg. Die Turnover-Zeit verkürzte sich von 81 auf 16 Tage, erhöhte sich dann aber wieder auf 97 Tage nach 168 h. Am Ende des Experiments lag sie wieder bei 27 Tagen. Im 3. Laborexperiment kam es zu einer Erhöhung der Stickstofffixierungsrate von 0,02 auf 0,13 pmol/ μ mol POC h⁻¹ innerhalb von 168 h. Anschließend ging die Rate leicht zurück, bevor sie zum Ende des Experiments wieder auf 0,12 pmol/ μ mol POC h⁻¹ anstieg. Die Turnover-Zeit nahm von 381 Tagen auf 53 Tage ab. Bei der Kontrolle stieg die Stickstofffixierungsrate von 0,06 auf 0,2 pmol/ μ mol POC h⁻¹ nach 120 h und nahm anschließend nur geringfügig ab. Die Turnover-Zeit reduzierte sich von 273 Tage auf 35 Tage.

Zugabe von Methylphosphonat

In einem zusätzlichen Laborexperiment wurde anstelle von Phosphat Methylphosphonat (Endkonzentration von 1,5 μ mol/L) als organische Phosphorquelle der phosphatverarmten *N. spumigena* Kultur CCY9414 verabreicht. Die Betrachtung der Phosphorfraktionen zeigte, dass innerhalb von 24 h DOP, welches das zugegebene Methylphosphonat beinhaltet, geringfügig anstieg und anschließend leicht abnahm. In der gleichen Zeit stieg POP leicht an. Zu Beginn des Experiments war DIP in geringen Konzentrationen nachweisbar, nahm leicht ab und lag am Ende des Experiments an der Nachweisgrenze (Abbildung 26 A). Der PolyP-Gehalt nahm innerhalb von 24 h von 6 auf 7 nmol/ μ mol POC zu, bevor dieser Wert wieder zurückging (Abbildung 26 B). POC nahm in den ersten 24 h von 80 auf 65 μ mol/L ab. Anschließend stieg die Konzentration bis zum Ende des Experiments nach 216 h auf 95 μ mol/L (Abbildung 26 C).

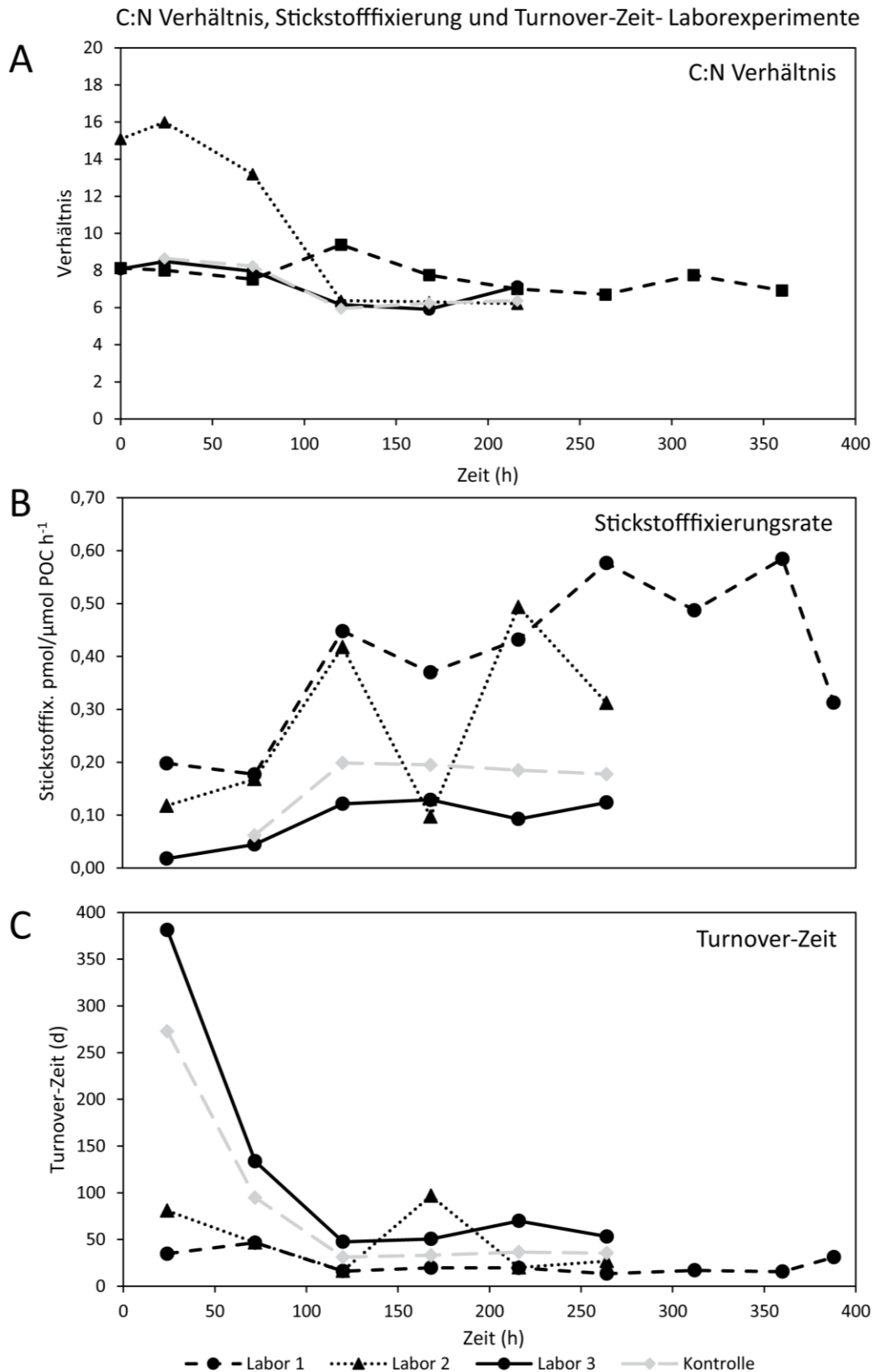


Abbildung 25) Veränderung des C:N Verhältnisses sowie Verlauf der Stickstofffixierungsrate und Turnover-Zeit für Stickstoff über die Zeit in den Freilandexperimenten. A) Die Veränderung im C:N Verhältnis. B) Die Veränderung der Stickstofffixierungsrate berechnet nach Montoya et al. (1996) und normalisiert auf POC. C) Die Veränderung in der Turnoverzeit berechnet nach Montoya et al. (1996).

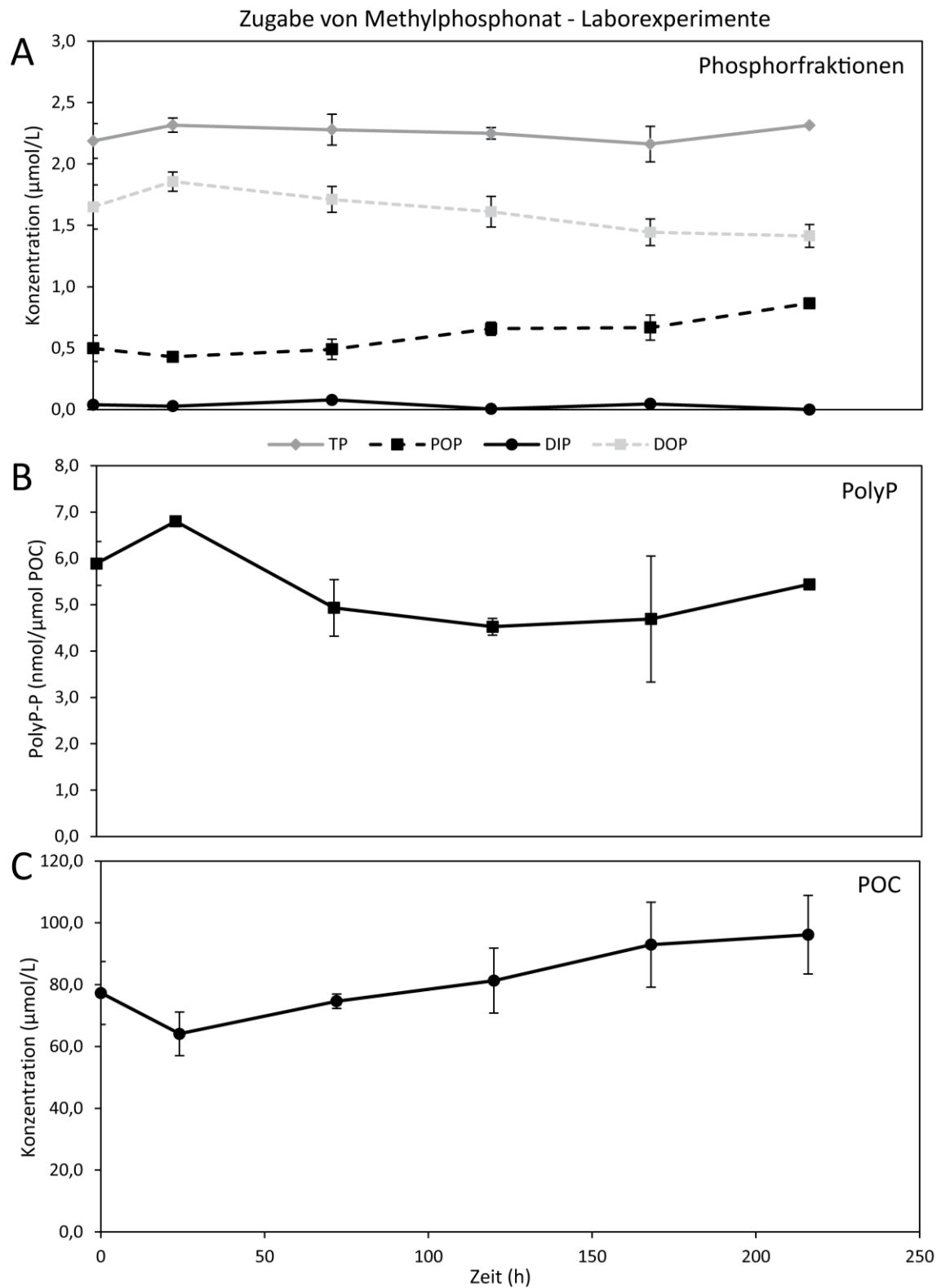


Abbildung 26) Ergebnisse Methylphosphonat-Experimente. Methylphosphonat mit einer Endkonzentration von $1,5 \mu\text{mol/L}$ stand als alleinige Phosphorquelle den Cyanobakterien zu Verfügung. A) Die Veränderungen der Phosphorfraktionen über die Zeit. Die DOP Konzentration gibt die Konzentration an Methylphosphonat im Wasser wieder. DIP war in geringer Konzentration messbar. POP nahm geringfügig zu. B) Veränderung des PolyP-P-Gehalts über die Zeit. C) Veränderung der POC-Konzentration über die Zeit, als Indikator für Biomassewachstum.

Mikroskopische Untersuchungen der Phosphorakkumulation in unterschiedlichen Zelltypen von *Nodularia spumigena*

In einer Voruntersuchung zu dieser Studie wurden Filamente von *N. spumigena* mit DAPI (Hupfer *et al.*, 2007) gefärbt, um zu prüfen, ob PolyP gebildet wurde. Durch die DAPI-Färbung können nur qualitative Aussagen über die PolyP-Gehalte der Cyanobakterien getroffen werden (Aschar-Sobbi *et al.*, 2008). Es wurde beobachtet, dass diese Einschlüsse nicht homogen über das Filament verteilt sind. Daraufhin wurden Untersuchungen mit dem NanoSIMS und dem REM durchgeführt, um diese heterogene Verteilung zu erfassen. Die nachfolgenden Ergebnisse sind in der Publikation von Braun *et al.* (2018) veröffentlicht.

Licht- und Fluoreszenzmikroskopie, sowie NanoSIMS Messungen

Filamente von den ersten drei Probenahmezeitpunkten der Freilandexperimente, in denen der größte Teil der Phosphoraufnahme erfolgte, wurde mit DAPI gefärbt und gaben am Fluoreszenzmikroskop einen ersten Eindruck über die PolyP Verteilung (Abbildung 27 B). Schon bei dieser geringen Vergrößerung zeigte sich, dass Heterocysten, im Vergleich zu den vegetativen Zellen, keine PolyP-Granula zu enthalten schienen (Abbildung 27 B). Da die Färbung jedoch nur ein indirekter Hinweis ist und die Sichtbarkeit der PolyP Granula durch dickere Zellwände der Heterocysten behindert sein könnte, wurde diese Beobachtung durch NanoSIMS-Analysen bestätigt. Das Verhältnis $^{31}\text{P}^-/^{12}\text{C}^-$ (Abbildung 27 C), sowie Einzelmessungen von $^{31}\text{P}^-$ gemessen entlang der Filamente, zeigten einen sehr niedrigen Phosphorgehalt in den Heterocysten im Vergleich zu vegetativen Zellen (Abbildung 27 C). Rot-Grün-Blau-Bilder (RGB) von $^{12}\text{C}^-$, $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ und $^{31}\text{P}^-$ zeigten ebenfalls nur in den vegetativen Zellen ein starkes Phosphorsignal (Abbildung 27 D). Mit einem Tiefenscan konnte das Phosphorsignal erst im Innern der Filamente detektiert werden, im Gegensatz zum Stickstoffsignal, welches bereits an der Oberfläche nachgewiesen werden konnte (Abbildung 27 F).

Messungen des Phosphorgehalts am REM/EDX

Um den Anstieg des intrazellulären Phosphors über die Zeit zu verfolgen, wurden Linienmessungen, sowie Punktmessungen an Filamenten von *N. spumigena* durchgeführt. Die Linienmessungen zeigten, dass die Phosphorsignale unter phosphorarmen Bedingungen in vegetativen Zellen und Heterocysten im Bereich von 110-180 Ereignisse s^{-1} lagen

(Abbildung 28 A). Nach einem Tag war das Phosphorsignal in den vegetativen Zellen etwa dreimal höher als zu Beginn des Experiments (Abbildung 28 B) und stieg nach drei Tagen auf bis zu 800 Ereignisse s^{-1} . Im Gegensatz dazu stieg nach einem Tag das Phosphorsignal in der Heterocyste nicht an und blieb in einem Bereich von 110-180 Ereignisse s^{-1} . Nach drei Tagen betrug der Phosphorgehalt in den Heterocysten 200 Ereignisse s^{-1} . Eine größere Anzahl von Punktmessungen (Abbildung 28 C) unterstützte dieses allgemeine Muster der Phosphoraufnahme. Die Phosphorwerte in den vegetativen Zellen waren nach einem Tag fünfmal höher als zu Beginn der Experimente. Nach drei Tagen waren die Werte neunmal höher. In den Heterocysten änderte sich der Phosphorgehalt weniger, obwohl ein leichter

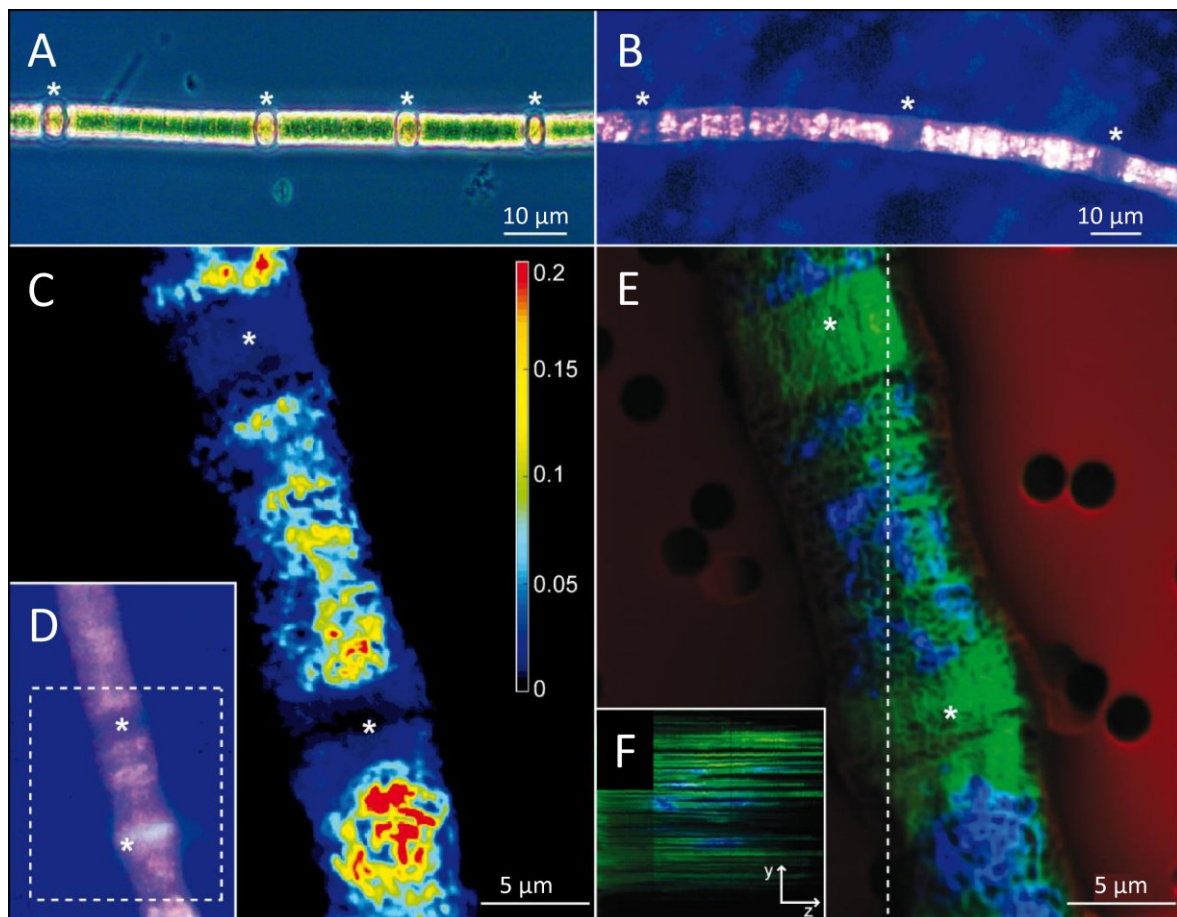


Abbildung 27: Mikroskopische Bilder von *N. spumigena* Filamenten, die mit verschiedenen mikroskopischen Techniken aufgenommen wurden. A) Lichtmikroskopie. B) Fluoreszenzmikroskopie; Filament wurde mit DAPI gefärbt; Polyphosphateneinschlüsse sind als hellgelbe/weiße Punkte sichtbar. C und D) NanoSIMS-Bilder; Das untersuchte Segment ist in der Fluoreszenzmikroskopie (D) mit einer gestrichelten Linie umrandet. C) Die Intensität von $^{31}P/^{12}C$ wird angezeigt. E) Überlagerungsbild von ^{12}C (rot; Filterhintergrund), $^{12}C^{14}N$ (grün, repräsentativ für das organische Material) und ^{31}P (blau); die gestrichelte Linie markiert die y-Achse des verbundenen Stapels durch das komplette Filament im eingefügten Bild (F). F) Zeigt die Verteilung von ^{31}P (blau) und $^{12}C^{14}N$ (grün) durch die Filamentbreite (z-Achse). Ein "*" in allen Bildern markiert einen Heterocyste. Abbildung entnommen und leicht modifiziert aus Braun et al. (2018).

Anstieg des Phosphors nach einem bzw. drei Tagen nachweisbar war. Eine Anreicherung von PolyP in Form von Granula konnte nicht beobachtet werden. Diese Unterschiede im Phosphorgehalt zwischen den Zelltypen und zwischen den Zeitpunkten waren statistisch signifikant (ANOVA: vegetative Zellen: $F = 101,3$, $p < 0,0001$; Heterocysten: $F = 160,7$; $p < 0,0001$; Tabelle 15/Tabelle 145).

Tabelle 14) ANOVA zur Überprüfung des statistisch signifikanten Unterschieds im Phosphorgehalt von vegetativen Zellen und Heterocysten zu verschiedenen Zeitpunkten. M = Mittelwert; d. f. = Freiheitsgrade

	Variation	Quadratsumme	d. f.	M	F-Wert	p-Wert
Vegetative Zellen	Zwischen den Gruppen	1.01E+06	2	5.05E+05	101.3	< 0.0001
	Innerhalb der Gruppe	2.14E+05	43	4.99E+03		
	Gesamt	1.22E+06	45			
Heterocysten	Zwischen den Gruppen	6.30E+04	2	3.15E+04	160.7	< 0.0001
	Innerhalb der Gruppe	4.71E+03	24	1.96E+02		
	Gesamt	6.77E+04	26			

Tabelle 15) T-Test zwischen vegetativen Zellen und Heterocysten zu unterschiedlichen Zeiten. Die Werte wurden aus dem Anregungsenergiepeak des Phosphors der Punktmessungen berechnet. M = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Messungen in vier (0 h) und drei (bei 24 h und 72 h) Filamenten; d. f. = Freiheitsgrade; cps = Ereignisse pro Sekunde

Vegetative Zellen					Heterocysten					
	M (cps)	SD (cps)	n	d. f.	M (cps)	SD (cps)	n	d. f.	t-Wert	p-Wert
0 h	57	19	14	13	52	21	8	7	0.55	0.59
24 h	260	19	15	14	101	9	10	9	25.20	< 0.0001
72 h	420	113	17	16	173	11	9	8	6.46	< 0.0001

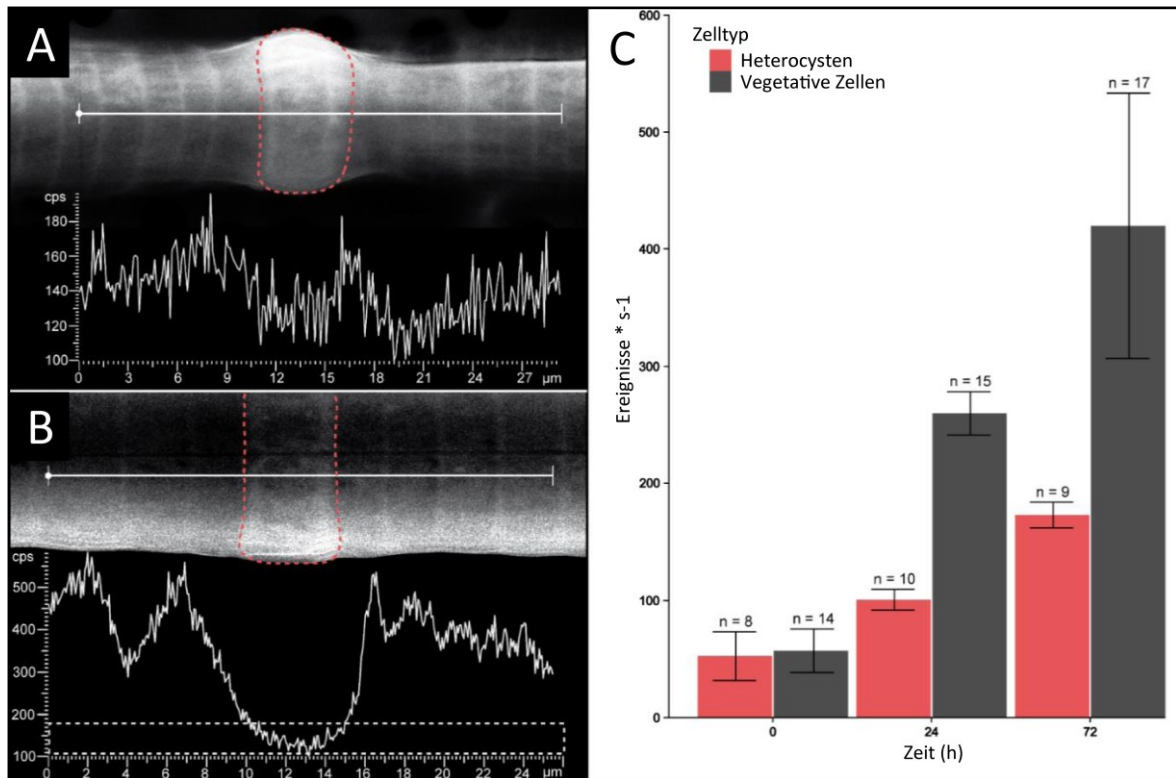


Abbildung 28: Phosphorakkumulation in vegetativen Zellen und Heterocysten in *N. spumigena* aufgenommen und analysiert mit dem REM. A und B) REM/EDX-Aufnahmen der *N. spumigena*-Filamente zu verschiedenen Zeitpunkten mit den entsprechenden Linienmessungen des Phosphorsignals. Die Signale von Phosphor über der gemessenen Linie (weiße Linie in den Filamenten) werden in Ereignissen s⁻¹ (counts s⁻¹; cps) angegeben; der mit einer gestrichelten roten Linie markierte Bereich zeigt die Heterocyste. A) 0 h nach Beginn des Experiments B) Nach 24 h der Inkubation; der mit einer gestrichelten Linie markierte Bereich zeigt den Wertebereich bei 0 h; in den Heterocysten blieben die Werte niedrig. C) Zeitlicher Verlauf der Veränderungen der Phosphorsignalintensität in vegetativen Zellen (grau) und Heterocysten (rot), berechnet aus dem Anregungsenergiepeak von Phosphor bei Punktmessungen. n = Anzahl der Messungen an vier (0 h) und drei (jeweils 24 h und 72 h) Filamenten. Abbildung entnommen und leicht modifiziert aus Braun et al. (2018).

Diskussion

Phosphataufnahme und Entwicklung der Biomasse in Abhängigkeit vom Ausgangszustand der Cyanobakterien

Die übergeordnete Frage dieser Arbeit war herauszufinden, ob sich der intrazelluläre Phosphorpool in *N. spumigena* in Abhängigkeit von der Phosphatverfügbarkeit ändert. Nach dem bisherigen Stand des Wissens liegt dieser Arbeit die Hypothese zugrunde, dass Phosphat, solange es verfügbar ist, aufgenommen und gespeichert wird, und dass in einer Phosphormangelsituation intrazelluläre Phosphorspeicher genutzt und reduziert werden, um eine Phosphorversorgung zur Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus, zu gewährleisten (Moisander *et al.*, 2003; Walve und Larsson, 2007, 2010). Kommt es zu einem erneuten Phosphateintrag im phosphorverarmten Oberflächenwasser, wie es bei Auftriebs-Ereignissen im Sommer der Fall ist, werden die intrazellulären Phosphorspeicher aufgefüllt und Phosphat kann wieder für metabolische Zwecke und Wachstum genutzt werden (Nausch *et al.*, 2009). Dies sollte sich dann in einer Erhöhung der Biomasse (POC und Chlorophyll a) sowie in der Stöchiometrie von C:P und N:P zeigen. Je besser die Versorgung mit Phosphat ist, desto geringer ist das C:P Verhältnis.

In dieser Studie reagierte die Cyanobakteriengemeinschaft der Ostsee in Abhängigkeit von der Phosphorsituation im Oberflächenwasser unterschiedlich. Die DIP-Konzentrationen im Ausgangswasser reichten von 0,28 $\mu\text{mol/L}$ bis zur Nachweisgrenze der Phosphatbestimmungsmethode (Tabelle 12 und 13). Im Gegensatz zu der oben genannten Hypothese konnte an Station 213, an der eine Phosphatkonzentration von 0,28 μM im Oberflächenwasser gemessen und noch Phosphat zugegeben wurde, keine Phosphoraufnahme gemessen werden. Dagegen kam es an den Stationen 245 und 282 zu einer sofortigen Abnahme von DIP um 32 % bzw. 38 %. Parallel dazu wurde eine Zunahme von POP um 28 % bzw. 37 % gemessen (Abbildung 10). In den Laborexperimenten wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt. Der Anteil von DIP am TP sank in den ersten 24 h im 1. und 2. Laborexperiment um 14 % bzw. 40 %, wohingegen das POP um 14 % bzw. 39 % stieg. Am Ende dieser Experimente war, im Gegensatz zu den Freilandexperimenten, DIP immer noch im Wasser nachweisbar. Einzige Ausnahme bildete die Kontrolle. Hier änderten sich die Phosphor pools nur geringfügig, weil kein Phosphat vorhanden war, das von den

Cyanobakterien aufgenommen werden konnte (Abbildung 19). Das Überangebot an DIP im 1. Laborexperiment zeigte, dass bei hohen DIP-Konzentration auch mehr aufgenommen wird, aber mehr DIP im Wasser verbleibt, als bei geringeren Ausgangskonzentrationen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Cyanobakterien nur bis zu einem bestimmten Grad ihre Phosphorspeicher füllen. Die Geschwindigkeit der Aufnahme von DIP und die Umwandlung in POP, hängt von der Phosphorversorgung der Zellen vor Beginn der Experimente ab, was auch an dem C:P und N:P Verhältnis zu sehen ist (Abbildung 11 und Abbildung 20). Ist noch ausreichend DIP im Wasser, wie an Station 213, ist es nicht weiter nötig DIP aufzunehmen, im Gegensatz zu den Experimenten mit Phosphatmangel im Ausgangswasser, in denen das zugesetzte Phosphat aufgenommen wurde. Aus diesen Beobachtungen kann die Hypothese abgeleitet werden, dass wenn sich die Cyanobakterien länger in einer Phosphat-Mangelsituation befinden, das hinzugegebene Phosphat umso schneller aufgenommen wird, je länger die Zellen den verarmten Bedingungen ausgesetzt waren. Daher läuft der Prozess an Station 282 schneller ab, als an Station 245. An Station 282 konnte im Wasser kein Phosphat mehr nachgewiesen werden, an Station 245 war noch Phosphat im Wasser nachweisbar. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass die Cyanobakterien erst wenige Tage vorher in die Mangelsituation kamen. In den Laborexperimenten zeigte sich ebenfalls, dass nach längerem Phosphatmangel die Geschwindigkeit der Aufnahme stieg. Ähnliche Ergebnisse wurden in der Grünalge *Chlorella vulgaris* von Wintermans (1955) beschrieben, der schlussfolgerte, dass Phosphormangel die Phosphataufnahmerate stimuliert. Des Weiteren konnten Aitchison und Butt (1973) in *C. vulgaris* zeigen, dass der Phosphatgehalt der Zellen unter Phosphatmangel abnahm, wenn diese zuvor in phosphatreichem Wasser wuchsen. Wurde *C. vulgaris* dann wieder in ein phosphatreiches Medium überführt, stieg die Aufnahmerate deutlich an.

Zusätzlich zur Phosphatkonzentration im Wasser, könnte die Geschwindigkeit der Aufnahme auch auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Biomasse in den Freilandexperimenten sowie auf abiotische Faktoren wie Wassertemperatur und Lichtintensität zurückzuführen sein. Die Wassertemperatur in den Freilandexperimenten lag durch Beschattungs- und Abkühlvorrichtungen an Deck des Forschungsschiffes bei 17 - 20 °C. Die Lichtintensität war durch Bewölkung und durch die ständige Bewegung des Schiffes nicht konstant, entsprach aber den natürlichen Bedingungen. Dagegen waren in

den Laborexperimenten ein zwölf stündiger Tag-Nacht-Rhythmus, konstante Lichtintensität und eine konstante Temperatur von 15 °C vorhanden.

In den bisher dargestellten Experimenten dieser Studie wurde DIP als alleinige Phosphorquelle eingesetzt. Ein zusätzliches Laborexperiment wurde mit der Zugabe von Methylphosphonat als organische Phosphorquelle durchgeführt (Abbildung 26). Die Phosphorfractionen veränderten sich aber, verglichen mit den anderen Experimenten, nur geringfügig. Es wird daher angenommen, dass *N. spumigena* CCY9414 diese Phosphorquelle nicht nutzen kann. Auch bei niedrigen Phosphatkonzentrationen im Wasser nimmt *N. spumigena* bevorzugt DIP auf und nutzt es für das Wachstum (Schoffelen *et al.*, 2018), was mit den in dieser Studie erzielten Ergebnissen übereinstimmt (Abbildung 7 - 10 und Abbildung 1717 - 19). *Aphanizomenon* sp. nutzt hingegen primär organische Phosphorquellen und deckt damit etwa 85 % des Phosphorbedarfs. *Dolichospermum* sp. kann sowohl DIP (60 %), als auch DOP (40 %) nutzen (Schoffelen *et al.*, 2018). Eine solche Trennung der Phosphorverwendung in einer natürlichen Cyanobakteriengemeinschaft ist überraschend, da kultivierte Isolate aller drei Cyanobakterien zumindest genetisch in der Lage sind, organisches Phosphat aufzunehmen und für das Wachstum zu verwenden (Wang *et al.*, 2012; Voß *et al.*, 2013; Šulčius *et al.*, 2015; Teikari *et al.*, 2018). In den Freilandexperimenten an den Stationen 213 und 245 betrug die Ausgangsbiomasse von *N. spumigena* 85 % bzw. 90% und die von *Aphanizomenon* sp. 15 % bzw. 10 %. Innerhalb von 72 h änderte sich die Biomasse an diesen Stationen dahingehend, dass fast nur noch *N. spumigena* vorhanden war (Abbildung 8). Demzufolge könnte *N. spumigena* einen Wachstumsvorteil gegenüber *Aphanizomenon* sp. haben, der möglicherweise in der besseren Nutzung vom DIP und dem Mangel an nutzbarem DOP liegt. An Station 282 befand sich ausschließlich *N. spumigena* im Wasser. Diese waren über einen längeren Zeitraum einer Phosphormangelsituation ausgesetzt, was vom C:P Verhältnis von 327:1 (Abbildung 11) abgeleitet werden kann. *Dolichospermum* sp. hingegen konnte das DIP nutzen und wuchs in den Experimenten, allerdings machte dieser Anteil in der Biomassezusammensetzung nur einen Bruchteil aus (Abbildung 8). Phosphormangel beeinflusst demnach die Zusammensetzung und Konzentration der Biomasse maßgeblich, da andere abiotische Faktoren nahe den optimalen Wachstumsbedingungen der Cyanobakterien (Wasmund, 1997) lagen. In Studien von Nausch *et al.* (2008, 2009) wurde der DOP Pool im Wasser in Bezug auf die Frage untersucht, ob dieser ausreicht, um eine

natürliche Cyanobakteriengemeinschaft mit genügend Phosphor zu versorgen. Für heterotrophe Bakterien der Ostsee wurde von Nausch und Nausch (2004) nachgewiesen, dass sie verstärkt DOP aufnehmen, nachdem das DIP im Wasser aufgebraucht war. Dabei hing die Nutzung organischen Phosphors davon ab, wieviel DOP vorhanden war. Bei einer Konzentration von $< 0,2 \mu\text{mol/L}$ lag vorwiegend inertes DOP vor, das für die heterotrophen Bakterien nicht nutzbar war. Bei einer hohen Konzentration von $0,44 \mu\text{mol/L}$ wurde $0,15 \mu\text{mol/L}$ DOP verwendet. In den Freilandexperimenten der vorliegenden Studie lag der DOP Wert um die $0,2 \mu\text{mol/L}$ und in den Laborexperimenten bei $0,05 - 0,01 \mu\text{mol/L}$. Überträgt man die Schlussfolgerung von Nausch und Nausch (2004) auf diese Studie, könnte das bedeuten, dass der DOP-Pool vermutlich für autotrophe Cyanobakterien inertes Material enthielt, was nicht nutzbar war.

Ein weiterer Faktor, der die Phosphataufnahme der Cyanobakterien beeinflusst, ist deren Phosphorgehalt, angezeigt durch das C:P Verhältnis. Zu Beginn der Freilandexperimente konnten hohe C:P Verhältnisse gemessen werden, die deutlich über dem Redfield Verhältnis von 106:1 (Redfield, 1934) lagen. Die Verhältnisse waren sogar noch höher, als die, die von Redfield *et al.* (1963) gemessenen Werte von 231:1 für eine unter Phosphormangel leidende Kultur von *Chlorella pyrenoidosa*. Anders als von Schoffelen *et al.* (2018) beobachtet, nehmen die hohen C:P Verhältnisse jedoch in fast allen Experimenten kurz nach der Zugabe von Phosphat ab, was deutlich die Aufnahme von DIP zeigt. Durch Wachstum der Cyanobakterien wurde das C:P Verhältnis in einigen Experimenten wieder größer (Station 213, 245 und 1. Laborexperiment). Für das N:P Verhältnis in den Experimenten mit der natürlichen Gemeinschaft konnten Werte von $> 10:1$ gemessen werden, wohingegen in den Laborexperimenten (ausgenommen die Kontrolle) Werte $< 10:1$ ausgemacht werden konnten. Geider und La Roche (2002a) beschreiben das N:P Verhältnis bei Cyanobakterien als sehr plastisch. Werte $< 5:1$ treten demnach auf, wenn Phosphat weit über Nitrat oder Ammonium verfügbar ist. Dagegen liegt das N:P Verhältnis bei $> 100:1$ wenn mehr anorganischer Stickstoff als Phosphor vorhanden ist oder wenn die Stickstofffixierung optimal abläuft. Unter optimalen nährstoffreichen Wachstumsbedingungen reicht das zelluläre N:P Verhältnis von 5 - 19:1. Ein kritischer Wert, der den Übergang von Stickstoff- zur Phosphorlimitation angibt, wäre laut Geider und La Roche (2002b) 15-30:1. Demnach besaß die *N. spumigena* CY9414 Kultur noch eine gute Stickstoffversorgung (ausgenommen der Kontrolle) und befand sich auch

nicht in einer Phosphatlimitation, wie von Geider und La Roche (2002b) beschrieben. Dagegen hatte die natürliche Cyanobakteriengemeinschaft zumindest in den ersten 72 h Phosphatmangel.

Fasst man Ergebnisse der Phosphatverfügbarkeit und der Stöchiometrie zusammen, kann gezeigt werden, dass die Phosphataufnahme durch Cyanobakterien von der vorausgegangenen Phosphorversorgung abhängig ist, das heißt, vom vorhandenen DIP im Ausgangswasser und vom zellulärem Phosphorgehalt. Bei ausreichend DIP im Wasser und/oder guter zellulärer Versorgung mit Phosphat und keinem extremen Überangebot von Phosphat (Station 213), kam es zu keiner messbaren Aufnahme. Bei einer vergleichbaren Ausgangssituation wurde jedoch bei Zugabe eines extremen Phosphatüberschusses das Phosphat aufgenommen. Somit konnten drei Faktoren (DIP-Konzentration, C:P Verhältnis und Relation der Phosphatgabe zur Ausgangsbedingung) identifiziert werden, die im Zusammenspiel darüber entscheiden, ob Phosphat aufgenommen wird, oder nicht. Die sich ändernden C:P und N:P Verhältnisse zeigen eine Phosphorakkumulation an, die für die Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus und das weitere Wachstum unter Phosphorstress, wie es von Larsson *et al.* (2001) und Walve und Larsson (2007 und 2010) beschrieben wurde, essentiell ist. Die Verhältnisse geben jedoch nicht wieder, in welchen zellulären Strukturen Phosphor eingelagert wird.

PolyP als intrazellulärer Phosphatspeicher

PolyP dient als ein zentraler Phosphorspeicher (u. a. Cole und Hughes, 1965) bei den unterschiedlichsten Organismen. In dieser Studie wurde davon ausgegangen, dass sowohl die natürliche Cyanobakteriengemeinschaft, als auch die Kultur von *N. spumigena* CCY9414, unter phosphorverarmten Situationen diese Speicher nutzen, um Phosphormangel im umgebenden Wasser auszugleichen und Strukturen, die für den Zellmetabolismus wichtig sind, aufrecht zu erhalten.

In den durchgeführten Freiland- und Laborexperimenten dieser Studie, führte die Phosphatzugabe innerhalb von 24 h zu einer Erhöhung des PolyP-Gehalts. Die einzige Ausnahme stellte das Experiment an Station 213 dar. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Filamente an dieser Station aufgrund des Vorhandenseins und der daraus resultierenden ausreichenden Versorgung mit Phosphat, kein Phosphat als PolyP

akkumuliert haben. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Aitchison und Butt (1973) in Experimenten mit *C. vulgaris*. In allen anderen Experimenten war nach der sprunghaften Zunahme, eine mehr oder weniger starke Abnahme an PolyP zu verzeichnen. Die Menge an akkumulierten PolyP hatte dabei keinen Maximalwert bzw. Schwellenwert. Sie hing vielmehr von der Menge ab, die anfangs dazugegeben wurde und der Phosphorversorgung vor Beginn jedes Experiments, sowie der Zusammensetzung der Cyanobakteriengemeinschaft. So wurde im 1. Laborexperiment ein deutliches Überangebot an Phosphat der *N. spumigena* CCY9414 Kultur bereitgestellt. In diesem Experiment wurde deutlich mehr PolyP gebildet als in den anderen Experimenten (Abbildung 18 A und 21 A). Der Grundgehalt an PolyP zu Beginn aller Laborexperimente war mit ca. 10 nmol PolyP/μmol POC gleich. In den Experimenten mit der natürlichen Cyanobakteriengemeinschaft lag der Grundgehalt niedriger (1,5 - 6 nmol PolyP-P/μmol POC) und es wurde weniger PolyP gebildet (Abbildung 12 und 18). In der natürlichen Cyanobakteriengemeinschaft befand sich teilweise auch *Aphanizomenon* sp. im Wasser. Es könnte sein, dass aufgrund unterschiedlicher Volumenverhältnisse (HELCOM, 2017) der Zellen von *N. spumigena* und *Aphanizomenon* sp., letztere eine geringere Anzahl von PolyP Granula bildeten. Sollte die PolyP Bildung durch das Zellvolumen beeinflusst sein, könnte *N. spumigena* aufgrund des ca. fünffach größeren Zellvolumens (Olenina *et al.*, 2006) mehr PolyP speichern. Eine wahrscheinlichere Erklärung wäre allerdings, dass die Ausgangssituation der Cyanobakterienpopulation an Station 245 und 282 wesentlich schlechter war, als in dem Experiment an Station 213 und den Laborexperimenten. Die Cyanobakteriengemeinschaft an Station 245 und 282 befanden sich schon länger in einer Phosphormangelsituation und hatten daher schon angefangen ihre PolyP-Speicher aufzubrechen, im Gegensatz zu den Cyanobakterien an Station 213, die noch nicht in der Mangelsituation waren. Der Wert von 6 nmol PolyP-P/μmol POC an Station 213 ist dementsprechend nahe an den 10 nmol PolyP-P/μmol POC, die in den Laborexperimenten gemessen wurden. Es könnte also sein, dass die hier verwendete natürliche Cyanobakteriengemeinschaft, und im speziellen *N. spumigena*, bei normaler Phosphatversorgung, sowie dem Beginn einer normal eintretenden Phosphormangelsituation eine natürliche Speicherkapazität von ca. 10 nmol PolyP/μmol POC besitzen.

Trotz der Aufnahme von Phosphat und Bildung von PolyP innerhalb von 24 h kommt es anschließend zu einer Abnahme, auch wenn noch genügenden Phosphat im Wasser

vorhanden ist. Die beobachtete Abnahme erfolgt allmählich und nicht so sprunghaft wie die Zunahme in den ersten 24 h (Abbildung 12 und 21). Des Weiteren fiel der Wert nicht unter den Ausgangswert zurück. Der langsame Abbau von PolyP deutet auf eine enzymatische Aktivität hin, die den intrazellulären Phosphattransfer steuert, der durch Polyphosphatkinasen (ppk) vermittelt wird. Diese Kinasen katalysieren die reversible Übertragung von hochenergetischen Phosphateinheiten aus PolyP zu ADP, um ATP aufzubauen (Cole und Hughes, 1965; Rao *et al.*, 2009; Achbergerová und Nahálka, 2011). Die Reversibilität des Enzyms wurde erstmals an *Escherichia coli* gezeigt (Kornberg *et al.*, 1956; Kornberg, 1957). Da das PolyP intrazellulär reversibel umgesetzt wird, müssen die Cyanobakterienzellen kein weiteres PolyP bilden. Erst wenn sie für einen längeren Zeitraum wieder einer Phosphormangelsituation ausgesetzt und ihre PolyP Speicher abgebaut wären, würden sie erneut verstärk PolyP akkumulieren.

Der Anteil an PolyP (gemessen in PolyP-P) am TP nahm innerhalb von 24 h in beiden Experimentansätzen zu. An Station 213, an der die Cyanobakterien in keiner Limitation waren, betrug dieser Anteil etwa 10 % und änderte sich nicht. Ähnliche Werte wurden von Grillo und Gibson (1979) für das Cyanobakterium *Synechococcus* beschrieben. An den anderen beiden Stationen dieser Experimentreihe stieg der Anteil von etwa 20 % auf über 50 % an. Unter vergleichbaren Phosphatbedingungen in den Laborexperimenten konnte ebenfalls ein Ausgangswert von ca. 20 % ausgemacht werden, welcher aber innerhalb von 24 h auf 50 % (2. Laborexperiment) und auf 80 % (3. Laborexperiment) anstieg. Gegen Ende des Experiments war der PolyP-Gehalt höher als der TP-Gehalt. Eine mögliche Erklärung wäre hier die unzureichende Anzahl an Messwiederholungen ($n = 4$, nicht wie üblich $n = 6$). In der Kontrolle dagegen sank der Anteil von 60 auf 40 %, was zeigt, dass es hier zu keiner PolyP Akkumulation kam. Eine bessere Aussage als die Anteilsberechnung von PolyP am TP, würde die Anteilsberechnung am POP ergeben. In den Laborexperimenten lagen die PolyP Werte aber über den POP Werten, sodass eine solche Berechnung nicht unternommen werden konnte. Das könnte daran liegen, dass in den Aufschlüssen zwar komplett PolyP aufgeschlossen wurde, aber die eingesetzten Reagenzien zur Detektion vom gesamt Phosphorgehalt zu gering bemessen waren, um die hohen Phosphorkonzentrationen vollständig abzubilden. Des Weiteren wurden die Proben für die PolyP Quantifizierung auf Filter konzentriert, die Mikrowellenaufschlüsse erfolgten aber aus der Gesamtprobe. In den Freilandexperimenten lagen die PolyP-Konzentrationen unter den PP-Konzentrationen und

es konnten Anteile von 60 - 80 % berechnet werden. Auch in anderen Studien wurde der Anteil von PolyP am TP berechnet. Es zeigt sich, dass diese Werte weit gestreut sind. So konnten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* 20 % (Liss und Langen, 1962), im grünen Schwefelbakterium *Chlorobium thiosulfatophilum* 40 % (Cole und Hughes, 1965) und im filamentösen Cyanobakterium *Anabaena variabilis* 50 % (Correll und Tolbert, 1962) ausgemacht werden. Aitchison und Butt (1973) zeigten, dass der Anteil von PolyP am TP in der Grünalge *C. vulgaris* ca. 5 % ausmacht und dass dieser Pool unter phosphorarmen Bedingungen innerhalb von 36 h aufgebraucht wird. Bei einer Überführung in phosphorreiches Medium wurde PolyP dann wesentlich schneller gebildet als zuvor. Andere Phosphorfraktionen waren nicht betroffen. Dieser Prozess soll spezifisch für Phosphormangel sein und nur dann auftreten, wenn überschüssiges Phosphat zugeführt wird und Licht für die Energieversorgung vorhanden ist. Die PolyP-Synthese ist demnach eine Folge der Stimulation der Phosphataufnahme, die durch die Hungerperiode ausgelöst wird. Die schnelle Speicherung von Phosphat in Form von PolyP von Zellen, die zuvor einem Phosphormangel ausgesetzt waren, wurde als „Überkompensation“ beschrieben (Brachet und Jeener, 1944; Liss und Langen, 1962) und bereits für Bakterien von Harold (1964) und für Pilze von Schmidt *et al.* (1946), Wiame (1947) und Harold (1960) beschrieben.

Hagemann *et al.*, (2019) beschrieb das Vorhandensein von PolyP in Zellen von *N. spumigena* CCY9414, welche unter Phosphormangel gehalten wurden. Es konnte aber kein PolyP in Zellen, die in phosphorhaltigem Medium herangezogen wurden, gefunden werden. Die PolyP Einlagerung wurde in derselben Studie auch bei *Aphanizomenon* sp. gezeigt. In der Studie von Hagemann *et al.* (2019) enthielt allerdings das verwendete phosphorfreie Medium (ASN III), indem die Cyanobakterien kultiviert wurden, noch 0,16 µM Phosphat und bei jedem Umsetzen der Kultur in frisches Medium, erhielten die Cyanobakterien einen erneuten Phosphatschub, was bei einer schnellen Akkumulation wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, zu einer sofortigen PolyP Bildung führt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Wert von 0,28 µM Phosphat (Station 213) bereits ausreicht, um *N. spumigena* hinreichend mit Phosphat zu versorgen. Die Konzentration von 0,13 µM im 1. Laborexperiment stellte bei den hier durchgeführten Untersuchungen auch noch keinen akuten Mangel dar. Erst Konzentrationen von < 0,07 µM (Stationen 245 und 282, sowie 1. und 2. Laborexperiment) erzeugten eine verarmte Situation. Eine mögliche Zusammenführung der Ergebnisse von Hagemann *et al.* (2019) mit den in dieser Studie

erzielten Ergebnissen wäre, dass bei ausreichender Versorgung der Cyanobakterien mit Phosphat, die Cyanobakterien keinem Phosphormangel ausgesetzt sind und daher kein PolyP bilden. Geht der Phosphatgehalt des Wassers allmählich zurück, werden die Gene exprimiert, die für die PolyP-Bildung zuständig sind. Es wird daraufhin aktiv PolyP gebildet, auch wenn noch geringe Mengen von $0,17 \mu\text{M}$ Phosphat (Hagemann *et al.*, 2019) im Medium vorhanden sind. Bei Konzentrationen von schätzungsweise $0,10 \mu\text{M}$ wird dann mehr und mehr PolyP akkumuliert. Werden die Bakterien, wie in den hier durchgeführten Experimenten, aber auch durch das Umsetzen in neues Medium (Hagemann *et al.*, 2019) erneut mit Phosphat versorgt, bzw. erhalten Zugriff auf Phosphat durch z. B. Auftriebs-Ereignisse oder andere Einträge, wird dieses mit einer erhöhten Geschwindigkeit aufgenommen und die Speicher werden gefüllt. Daraus kann abgeleitet werden, dass ein PolyP-Gehalt von ca. $0,10 \mu\text{M}$ notwendig ist, damit Zellfunktionen ablaufen können. Unter extremen Mangelbedingungen geht dieser Wert aber deutlich zurück.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cyanobakterien Phosphor in Form von Phosphat bei eintretender Phosphormangelsituation zunächst als PolyP speichern. Wenn diese Speicher gefüllt sind, wird Phosphor von PolyP auf andere Zellkomponenten übertragen, unabhängig davon, ob noch Phosphat im Wasser vorhanden ist oder nicht.

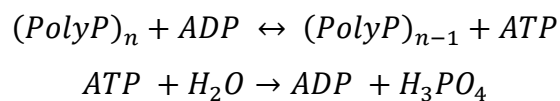
Änderungen im ATP-Gehalt

ATP ist als Energieträger in jedem Organismus vorhanden und damit auch eines der Zellkomponenten mit einem hohen Phosphorgehalt (Björkman und Karl, 2001). ATP vermittelt den Transfer von Energie und gilt als Indikator für den energetischen Zustand einer lebenden Zelle. Daher wurde es früher zur Bestimmung der Bakterienbiomasse benutzt (Holm-Hansen und Booth, 1966; Hodson *et al.*, 1976; Chida *et al.*, 2012). Unter Phosphormangelsituationen wird von den Cyanobakterien verstärkt das im Wasser verbliebene Phosphat akkumuliert. Der Prozess der PolyP Bildung ist energieaufwendig und daher wird viel ATP benötigt und verbraucht. Folglich sollte man in den ATP Messungen einen Rückgang im ATP-Gehalt erkennen.

ATP nahm in den ersten Stunden der Freilandexperimente gemessen am POC kaum ab (Abbildung 13), in den Laborexperimenten hingegen schon (Abbildung 22). Eine Abnahme des ATP-Gehalts lässt sich aber zumindest in den Freilandexperimenten an Station 245 und 282 über eine Anteilsberechnung von ATP am POP-Pool zeigen. Der Anteil sank an beiden

Stationen innerhalb von 24 h nach Inkubationsstart, machte aber nicht mehr als 1 % aus (Abbildung 13). In allen Experimenten kam es im weiteren Verlauf zu einem Anstieg bzw. einer Neubildung von ATP. Dies könnte daran liegen, dass ein geringer Teil des zuvor gebildeten PolyPs genutzt wurde, um neues ATP zu generieren, welches dann für andere metabolische Prozesse zur Verfügung steht. Die Abnahme von PolyP und die Neubildung von ATP korrelieren miteinander (siehe Anhang), jedoch liegt der Gehalt von PolyP um mehr als Faktor 100 höher als der Gehalt von ATP.

Der Transfer von Phosphat von PolyP zu ATP ist reversibel. Proteine, die eine ppk2 (Polyphosphatkinase2) Domäne besitzen sind für die PolyP-abhängige Phosphorylierung von ADP zu ATP zuständig, während Proteine, die zwei fusionierte ppk2-Domänen enthalten, Phosphorylierung von AMP zu ADP katalysieren (Resnick und Zehnder, 2000; Nocek *et al.*, 2008). Das Enzym ATPase hydrolysiert ATP dann wieder zu ADP + H₃PO₄ bzw. Orthophosphat (Cole und Hughes, 1965).



Cole und Hughes (1965) gehen davon aus, dass das Aufspalten des PolyPs durch das ADP kontrolliert wird und, dass hohe Konzentrationen von ADP die Orthophosphat-Freisetzung und ATPase-Aktivität hemmen. Des Weiteren kommt es zu einem Nettoabbau von PolyP, wenn große Mengen an ATP benötigt werden (Harold, 1963). Wenn ATP über andere Wege durch Photophosphorylierung (Arnon, 1959) gebildet wird, kann PolyP verstärkt synthetisiert werden (Cole und Hughes, 1965). In dieser Arbeit konnte kein solcher Weg aufgezeigt werden. Es lässt sich aber ganz klar zeigen, dass die Phosphataufnahme und die damit verbundene Bildung von PolyP mit ATP gekoppelt ist.

Lipidzusammensetzung der Cyanobakterien unter Phosphormangel

Zu den wichtigsten biochemischen Reservoirs von Phosphor im marinen Plankton zählen die Phospholipide, die Bestandteil der Zellwände und Membranen sind (Geider und La Roche, 2002; Van Mooy *et al.*, 2006; Van Mooy und Devol, 2008). Als eine Reaktion auf phosphatlimitierende Bedingungen in der Umwelt kann Phytoplankton Phospholipide,

insbesondere Phosphatidylglycerol, durch Sulfolipide ersetzen (Benning *et al.*, 1993). Von Van Mooy *et al.* (2009) wurde angenommen, dass in Zeiten der Phosphorlimitation Cyanobakterien ihren zellulären Phosphormangel ausgleichen, indem sie in den Membranen Phospholipide durch Nicht-Phosphorlipide, wie schwefel- und stickstoffhaltige Membranlipide, ersetzen. Es kann also angenommen werden, dass es unter einer langanhaltenden Phosphorlimitation auch bei der Cyanobakteriengemeinschaft der Ostsee, im Speziellen bei *N. spumigena*, zu einem solchen Umbau der Membranlipide kommt. Diese Umwandlung würde den Zellen neues Phosphat bereitstellen, welches für andere metabolische Zwecke genutzt werden könnte.

Die Lipidzusammensetzung von Cyanobakterien unterscheidet sich von anderen Bakterien, bei denen Phospholipide die größte Lipidgruppe bilden, wohingegen Phospholipide bei Cyanobakterien nur einen geringen Anteil an der Lipidzusammensetzung ausmachen (Murata und Nishida, 1987; Lechevalier und Lechevalier, 1988; Benning, 1998). Cyanobakterien besitzen vier Glycerolipideklassen (MGDG, DGDG, SQDG und PG), welche ebenfalls in der inneren Hüllmembran und der Thylakoidmembran der Chloroplasten von höheren Pflanzen vorkommen (Joyard *et al.*, 2006). Bei den in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen, konnten diese Lipide sowohl in den Experimenten mit der natürlichen Cyanobakteriengemeinschaft, als auch in den Laborexperimenten nachgewiesen werden (Abbildung 14 und 23). Der Gehalt von MGDG, DGDG und SQDG änderte sich während der Experimente nur geringfügig. MGDG machte mit 40 - 50 % (Freilandexperimente) bzw. 60 - 70 % (Laborexperimente) den höchsten Anteil an der Lipidzusammensetzung aus. SQDG machte 30 % bzw. 20 % und DGDG 20 % bzw. 10 % aus. Das Phospholipid PG hatte einen Anteil von jeweils 10 % in beiden Experimenten. Diese Ergebnisse sind konform mit denen, die in der Literatur beschrieben wurden. MGDG macht demnach ca. 50 % aus, wohingegen DGDG, SQDG und PG je 5 - 25 % ausmachen (zusammengefasst von Wada und Murata, 1998). In einigen Studien wird Monoglucosyldiacylglycerol (GlcDG) als ein weiteres Glycerolipid beschrieben (Naoki und Norio, 1982a, 1982b; Sato, 2015), welches akkumuliert wird, wenn die Bakterien auf glukosehaltigem Medium wachsen (Sato, 1994). Diese Lipidklasse macht aber nur 1 % der Glycerolipide aus und wurde in den hier durchgeführten Experimenten nicht berücksichtigt. Des Weiteren gibt es neben PG eine Vielzahl anderer Phospholipide, die in der Analytik miterfasst wurden (siehe Ergebnisse), aber unterhalb der Nachweisgrenze der Q-TOF-Messmethode lagen. PG war das einzige

Phospholipid, welches in messbaren Konzentrationen vorkam. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die hier untersuchten Cyanobakterienarten eine Lipidzusammensetzung besitzen, wie sie generell für Cyanobakterien angenommen werden kann (Wada und Murata, 1998; Boudière *et al.*, 2014) und keine außergewöhnlichen Lipidklassen besitzen (Sallal *et al.*, 1987; Kunimitsu *et al.*, 1993).

Der Gehalt von PG veränderte sich während der Experimente kaum. In der Betrachtung der Zusammensetzung der Fettsäuren erfolgte eine Umwandlung von 34:1 zu 34:3 (Abbildung 24). Die 34:3 Gruppe besteht wahrscheinlich aus einer Palmitinsäure (16:0; gesättigt) und α -Linolensäure (18:3; mehrfach ungesättigt), welche zu den häufigsten Fettsäuren in Cyanobakterien zählen (zusammengefasst in Wada und Murata, 1998). Dieser Umbau könnte damit begründet werden, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren für das Wachstum und die Fähigkeit, die Photoinhibition der Photosynthese zu tolerieren, wichtig sind und daher in Stresssituationen verstärkt gebildet werden (Wada und Murata, 1990; Wada *et al.*, 1990, 1992; Gombos *et al.*, 1992, 1994; Tasaka *et al.*, 1996). Bei einer Erhöhung des Anteiles an gesättigten Fettsäuren verringert sich die Dehnung und Fluidität der Membranen (Chapman, 1975), was bedeuten könnte, dass die Fluidität der Membranen der Cyanobakterien aufrecht erhalten bleibt, aber auch, dass die Membranen versteift werden. Beides kann als Reaktionen auf sich verschlechternde Umweltbedingungen gedeutet werden (Murata und Nishida, 1987). Für eine konkretere Aussage müsste man die Zusammensetzung der einzelnen Fettsäuren kennen. Die Fettsäurezusammensetzung von Cyanobakterien unterscheidet sich von der der meisten Bakterien, die nur gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren synthetisieren (zusammengefasst von Benning, 1998). Cyanobakterien besitzen jedoch, wie auch in dieser Studie gezeigt, mehrfach ungesättigte Fettsäuren. In verschiedenen Studien wurde untersucht, ob sich ändernde Umweltbedingungen einen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung haben (Al-Hasan *et al.*, 1989; Piorreck und Pohl, 1984; Huflejt *et al.*, 1990; Khomutov *et al.*, 1990; Molitor *et al.*, 1990; Van Mooy *et al.*, 2006, 2009; Boudière *et al.*, 2014). In Bezug auf Phosphorlimitation wurde gezeigt, dass Cyanobakterien, die ständig einem Phosphormangel ausgesetzt waren, PG durch SQDG ersetzen (Van Mooy *et al.*, 2006, 2009; Boudière *et al.*, 2014). Dadurch verringert sich vor allem die Phospholipidsyntheserate, wodurch die Cyanobakterien einen Vorteil in der Konkurrenz um Phosphor gegenüber anderen Bakterien bekommen, da bei diesen die Phospholipidsyntheserate weiterhin hoch bleibt und sie dadurch den Phosphor

nicht für andere zelluläre Prozesse nutzen können (Van Mooy *et al.*, 2009). Die Ergebnisse zeigen keinen Ersatz von Phospholipiden durch schwefelhaltige Lipide auf. Dies ist wahrscheinlich auf die zu geringe Laufzeit der Experimente zurückzuführen. Es kann dennoch angenommen werden, dass es zu einer Phospholipid-Substitution bei langanhaltenden Phosphormangelbedingungen kommt und die Cyanobakterien der Ostsee durch ihren geringen Anteil an PG in der Lipidzusammensetzung einen evolutionären Vorteil gegenüber anderen z. B. heterotrophen Bakterien besitzen. Der Gehalt und die Zusammensetzung von PG sind demnach nicht nur artabhängig, sondern werden auch durch die Umwelt beeinflusst.

Phosphatspeicherung in Heterocysten und vegetativen Zellen

Durch mikroskopische Untersuchungen an *N. spumigena*, stellte sich die Frage nach der Lokalisation der Phosphorspeicher in den Zellen. PolyP wurde schon in anderen Studien mittels unterschiedlicher mikroskopischer Untersuchungen nachgewiesen (z. B. Brock und Schulz-Vogt, 2011; Langer *et al.*, 2018; Schoffelen *et al.*, 2018; Hagemann *et al.*, 2019; Möller *et al.*, 2019; Schulz-Vogt *et al.*, 2019). PolyP konnte mittels DAPI-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie nur in vegetativen Zellen und nicht in Heterocysten nachgewiesen werden (Abbildung 27). Daher wurde davon ausgegangen, dass es einen Unterschied in der Zellverteilung der PolyP-Speicherung geben muss. Um dies zu überprüfen, wurden Untersuchungen mit dem REM und dem NanoSIMS durchgeführt. Diese Ergebnisse sind bereits in der Publikation "Differences in accumulation of phosphorus between vegetative cells and heterocysts in the cyanobacterium *Nodularia spumigena*" (Braun *et al.*, 2018) erschienen und werden im nachfolgenden nochmals diskutiert.

Heterocysten sind differenzierte Zellen, die sich auf die Fixierung von N_2 in einer aeroben Umgebung spezialisiert haben. Unter Lichteinfluss erzeugt das Photosystem I ATP. Es findet jedoch keine photosynthetische Produktion von O_2 statt, da das Photosystem II fehlt. Des Weiteren muss die in den Heterocysten befindliche Nitrogenase vor O_2 geschützt werden. Eine Vielzahl von Mechanismen, wie z.B. eine erhöhte Respirationsrate und eine Umwandlung der Zellmembran tragen zu diesem Schutz bei (Wolk *et al.*, 1994). Reduktionsmittel erhalten die Heterocysten aus vegetativen Zellen. Im Gegenzug wird Stickstoff in Form von Glutamin und anderen Aminosäuren (Böhme, 1998; Golden und Yoon, 2003) aus den Heterocysten in die vegetativen Zellen transportiert (Abbildung 29).

Bislang ist nicht bekannt, wie dieser Transport genau funktioniert und welche Moleküle dafür verantwortlich sind (Wolk *et al.*, 1994). Das Gen *hetR* ist das Gen, welches bei Stickstoffmangel die Differenzierung vegetativer Zellen zu Heterocysten steuert. Dabei ist noch unklar, wie bestimmt wird, welche vegetativen Zellen sich umbilden sollen und welche intrazellulären Mechanismen nach einer Initiierung der Differenzierung ablaufen. Der Unterschied in der Phosphorakkumulation zwischen Heterocysten und benachbarter vegetativer Zelle zeigt deutlich, dass die PolyP-Bildung eine spezifische physiologische Reaktion vegetativer Zellen ist. Da Heterocysten aus vegetativen Zellen entstehen (Wolk *et al.*, 1994; Hupfer *et al.*, 2007), kann davon ausgegangen werden, dass sie die für die PolyP-Akkumulation erforderlichen Gene besitzen, aber ihr physiologischer Zustand die PolyP-Bildung verhindert. Warum es zu einer Inhibierung der Gene kommt ist unklar, aber für das Verständnis der PolyP-Akkumulation ist dies ein sehr wichtiges Ergebnis. Die meisten Studien zur Quantifizierung von PolyP, z. B. in den oligotrophen Ozeanen (Diaz *et al.*, 2008; Martin und Van Mooy, 2013) haben die, für die beschriebene PolyP-Verteilung verantwortlichen Organismen, nicht identifiziert. Doch selbst wenn diese Organismen bekannt wären, wäre es nach den Erkenntnissen dieser Studie auch notwendig den aktuellen Stoffwechsel der Zellen zu kennen, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen. In den hier durchgeführten Experimenten unterschied sich zu Beginn der Experimente die Menge an Phosphor in den beiden Zelltypen eines Filaments nicht (Abbildung 28). Daher scheint es eine Grundmenge an Phosphor in allen Zellen zu geben, wahrscheinlich in Form von DNA, RNA, Phospholipiden, ATP, NADPH usw. Im Verlauf der Experimente konnte eine Zunahme im Phosphorgehalt in den vegetativen Zellen, als auch in den Heterocysten gemessen werden, wobei die Zunahme deutlich schneller und stärker in den vegetativen Zellen war. Bei den Untersuchungen mit REM und NanoSIMS konnten PolyP-Einschlüsse ausschließlich in vegetativen Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 27 und 28). Da sich Heterocysten nicht mehr teilen, müssen sie möglicherweise keinen zusätzlichen Phosphor in Form von PolyP anreichern. Dadurch, dass die Gene für das Photosystems II in den Heterocysten nicht exprimiert werden, besitzen diese eine wesentlich geringere CO₂-Fixierfähigkeit als vegetativen Zellen (Fay und Walsby, 1966), da dieser Prozess mit der Stickstofffixierung um Reduktionsmittel und ATP (zusammengefasst von Haselkorn, 1978) konkurriert. Ein weiterer Grund für das Fehlen von PolyP-Einschlüssen könnte das Alkalisieren der Heterocysten durch die Bildung von Ammonium

bei der Stickstofffixierung sein (Pick *et al.*, 1990; Pick und Weiss, 1991), das eine Hydrolyse von PolyP verursacht. Heterocysten besitzen ungewöhnlich dicke Zellwände, die Glyko- und Phospholipide, sowie eine Polysaccharidschicht enthalten (Nichols und Wood, 1968; Murata und Nishida, 1987b; Ernst *et al.*, 1992; Soriente *et al.*, 1992), damit die O₂-sensitive Nitrogenase geschützt ist. Der leichte Anstieg des Phosphorgehalts könnte auf den Aufbau dickerer Zellwände und die Speicherung von Phospholipiden in diesen zurückzuführen sein. Eine weitere Erklärung für die Phosphorzunahme könnte der Energiebedarf zur Aufrechterhaltung der Nitrogenaseaktivität sein. Energie in Form von ATP und NADPH wird aus Kohlenhydraten (Maltose) gewonnen, die von den benachbarten vegetativen Zellen geliefert werden. Nach Haselkorn (1978) und Böhme (1998) wird innerhalb der Heterocysten Maltose zu Glukose-6-phosphat umgewandelt. Dieses wird weiter zu 6-Phosphogluconsäure und anschließend weiter zu Ribulose-5-phosphat gespalten. Dieser Prozess liefert zwei Moleküle NADPH. Der Transportmechanismus von Maltose in den Heterocysten sowie die nachfolgenden Reduktionsprozesse zu Glukose-6-phosphat sind noch unbekannt (Haselkorn, 1978, Abbildung 29). Die in dieser Studie erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Phosphor, der in den Heterocysten gemessen wurde, vermutlich in Form von Zuckerphosphat, Phosphogluconsäure, ATP und NADPH vorkommt. Die Notwendigkeit von ATP und NADPH, die Stickstofffixierung aufrechtzuerhalten, könnte demnach erklären, warum auch in den Heterocysten ein leichter Anstieg des Phosphors zu finden war. Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, wie der Prozess der Phosphoreinlagerung in die Heterocysten abläuft. Es ist möglich, dass alle diese Unterschiede im Stoffwechsel der beiden Zelltypen dazu dienen, Heterocysten von zahlreichen Belastungen wie z.B. Radikale, Stickstoff- oder Energiebegrenzung, pH-Wert usw., zu schützen. Im Gegensatz zu den vegetativen Zellen benötigen sie daher kein PolyP mehr, um ihre Reaktion auf physiologischen Stress zu regulieren (Pick *et al.*, 1990; Pick und Weiss, 1991; Ernst *et al.*, 1992; Fay, 1992; Böhme, 1998; Kuroda und Ohtake, 2000). Welcher Grund auch immer hinter diesem ausgeprägten Unterschied der PolyP-Bildung steht, die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Aufgabenteilung zwischen Heterocysten und vegetativen Zellen in Cyanobakterien nicht nur auf die Stickstofffixierung beschränkt ist.

Die Stickstofffixierung der Cyanobakterien

Die Phytoplanktonentwicklung in der Ostsee ist in erster Linie vom Vorhandensein von Stickstoff abhängig (Wasmund *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit untersuchten diazotrophen Cyanobakterien sind alle in der Lage N_2 zu fixieren (Abbildung 16 B und 25 B), wodurch sie nicht von der Stickstofflimitation betroffen sind. Cyanobakterien sind nur durch Phosphor limitiert. Ein Phosphatüberschuss begünstigt daher das Wachstum dieser Cyanobakterien (Sellner, 1997). Diazotrophe Cyanobakterien setzen sich dadurch gegenüber anderen autotrophen Organismen durch und dominieren die Phytoplanktongemeinschaft. Unter Phosphormangel kommt die Stickstofffixierung zum Erliegen (Wu *et al.*, 2000; Capone, 2001). Sobald die Cyanobakterien wieder ausreichend mit Phosphor versorgt sind, steigt die Stickstofffixierung. Die Stickstofffixierungsrate (berechnet nach Montoya *et al.*, 1996) sank an Station 213, wohingegen sie an den Stationen 245 und 282 teilweise steil zunahm. Ein ähnlicher Verlauf, wie an den beiden letzten Stationen, lässt sich in allen Laborexperimenten beobachten, einhergehend mit einer Verkürzung der Turnover-Zeit für Stickstoff (Abbildung 16 B und C, 25 B und C). Man kann daraus schließen, dass die Cyanobakterien durch Zugabe von Phosphat nach einer Phosphorlimitation, die Stickstofffixierung nach einer kurzen Adaptationsphase wieder aktivierten. Die N_2 -Fixierungsaktivität zeigte in fast allen Experimenten einen mehr oder weniger deutlichen Zusammenhang mit der Aufnahme vom Phosphat (Abbildung 10 und 16 für Freilandexperimente und Abbildung 18 und 25 für Laborexperimente). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Schoffelen *et al.* (2018), der für drei Cyanobakterienarten einen Zusammenhang von Stickstofffixierungsrate und Phosphornutzung ausmachen konnten. In Experimenten von Huber (1986) und Moisaner und Paerl (2000) wurde gezeigt, dass es in *N. spumigena* zu einer Erhöhung der Nitrogenase-Aktivität kommt, wenn unter Phosphormangel den Cyanobakterien Phosphat bereitgestellt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass es durch die Zugabe von Phosphat zu einer Erhöhung der Heterocystenfrequenz kommt. Eine solche Erhöhung konnte in der vorliegenden Studie nicht gezeigt werden. Darüber hinaus kann die Stickstofffixierung durch andere Faktoren wie die Tageslichtdauer (Huber, 1986) beeinflusst werden. Die erzielten Ergebnisse zur Stickstofffixierungsrate, sowohl in der natürlichen Cyanobakterien-gemeinschaft, als auch in der *N. spumigena* CCY9414 Kultur, untermauern die Aussage der Experimente von Huber (1986). Folglich ist die Verfügbarkeit von Phosphat ein essentieller Faktor für die Stickstofffixierung und Heterocystenbildung von Cyanobakterien.

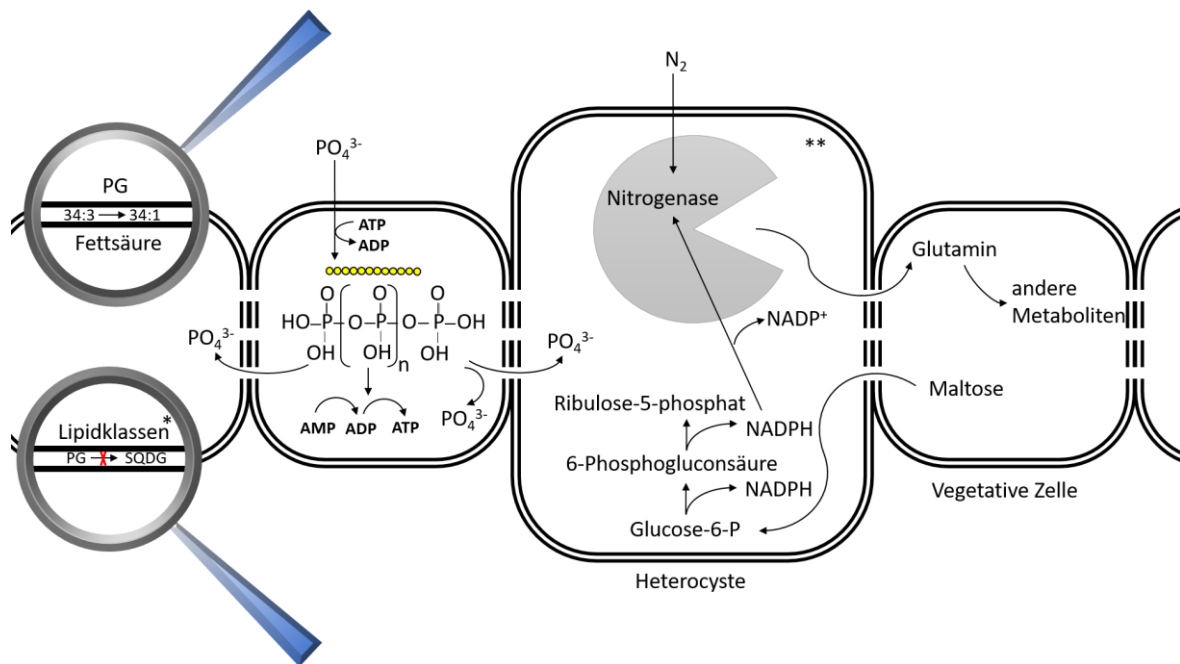


Abbildung 29) Darstellung der Phosphataufnahme nach den Erkenntnissen dieser Arbeit. Phosphat (PO_4^{3-}) wird unter ATP Verbrauch in der Zelle aufgenommen und als PolyP gespeichert. ATP kann wieder aus PolyP regeneriert werden. Phosphat kann vom PolyP abgespalten werden und steht den Zellen zur Verfügung. Der Transport von Phosphat aus vegetativen Zellen in die Heterocyste ist unbekannt, ebenso der von Haselkorn (1978) beschriebene Transport von Maltose. Eine Umwandlung der Fettsäurezusammensetzung von PG findet ebenfalls statt, jedoch keine Substitution der Lipidklassen. In der Heterocyste wird durch die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat in Ribulose-5-Phosphat NADPH gebildet, dass die Nitrogenase für die Fixierung von N_2 benötigt. Stickstoff in Form von Glutamin wird den vegetativen Zellen bereitgestellt.

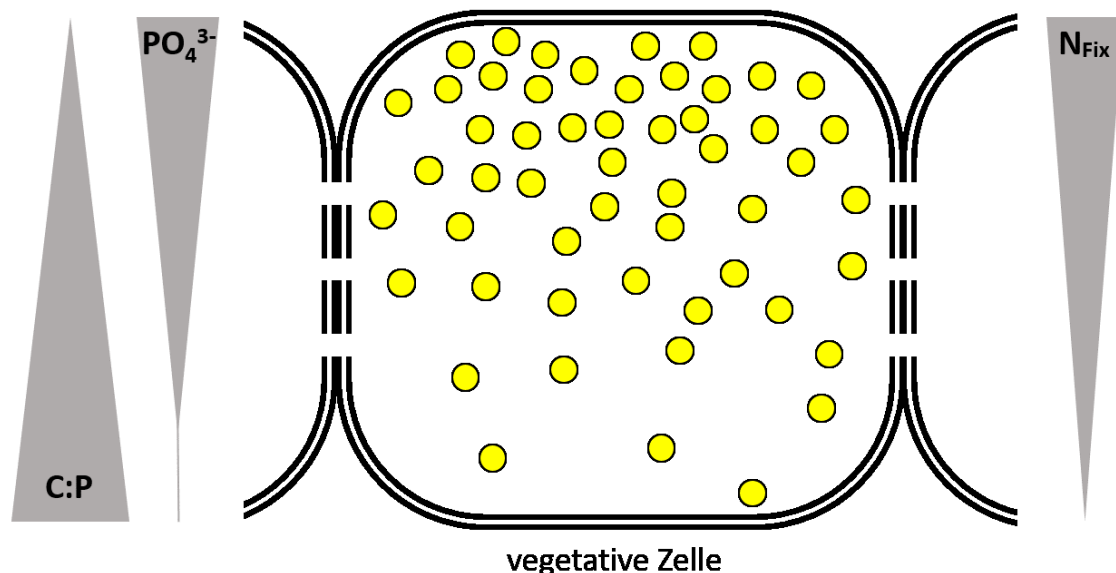


Abbildung 30) Darstellung der Bedeutung von Phosphormangel für Cyanobakterien. Mit sinkender Phosphatkonzentration im Wasser, nimmt der PolyP Gehalt der Zellen ab. Gleichzeitig kommt es zu einer Erhöhung des C:N Verhältnisses und einer Reduktion der Stickstofffixierung. Diese kommt aber bei sehr geringen Phosphatkonzentrationen und hohen C:P Verhältnissen nicht zum Erliegen, so dass immer noch Stoffwechselaktivität vorhanden ist.

Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Studie war, die Physiologie von ausgewählten diazotrophen, filamentösen Cyanobakterien der Ostsee in Bezug auf Phosphormangel bzw. -verfügbarkeit besser zu verstehen. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen ganz deutlich, dass sich die intrazellulären Phosphorspeicher, wie PolyP, Phospholipide und ATP unter Phosphormangel verringern bzw. ändern. Sobald Phosphat verfügbar ist, erhöhen sich diese Pools erneut. Den größten Phosphorspeicher stellt das PolyP da. Geht die Phosphorkonzentration im Wasser zurück und unterschreitet einen bestimmten Schwellenwert, fangen die Cyanobakterien an, das noch vorhandene Phosphat zu akkumulieren und als intrazelluläres PolyP zu speichern (Abbildung 29). Durch die Anlegung von intrazellulären Phosphorspeicher kompensieren die Cyanobakterien für eine gewisse Zeit den Phosphormangel im Wasser. Die Akkumulation tritt unmittelbar auf und geschieht mit einer hohen Geschwindigkeit. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit kann ganz klar gesagt werden, dass Phosphat nach der Aufnahme nicht direkt in die Zellstrukturen, die unmittelbar an metabolischen Prozessen beteiligt sind, eingebaut wird. Aufgenommenes Phosphat wird zunächst als PolyP gespeichert. Damit nimmt PolyP als primärer Speicher für Phosphat eine zentrale Rolle im Metabolismus der Cyanobakterien ein. C:P Verhältnisse von $\sim 300:1$ deuten auf einen Phosphormangel hin. Bei diesen C:P Verhältnissen konnten jedoch noch $1 - 2 \text{ nmol PolyP-P} / \mu\text{mol POC}$, sowie C:N Verhältnisse von $8:1$ und eine Stickstofffixierung von $0,2 \text{ pmol} / \mu\text{mol POC h}^{-1}$ gemessen werden. Das bedeutet, dass trotz eines vermeintlichen Phosphormangels Stoffwechselaktivitäten reduziert stattfinden und die Cyanobakterien überlebensfähig sind (Abbildung 30). Eine Phosphorlimitation im Sinne, dass der Zellstoffwechsel zusammenbricht und die Cyanobakterien absterben, wird durch die bisherigen Kriterien (Phosphatdefizit im Wasser und hohe C:P und N:P Verhältnisse) nur begrenzt angezeigt. Demzufolge sollte von phosphorverarmten Bedingungen gesprochen werden, wenn im Wasser kein Phosphat gemessen werden kann, aber Cyanobakterien aufgrund ihrer Speicher nicht phosphorlimitiert sind. Eine Phosphorlimitation liegt erst dann vor, wenn das System in sich zusammenbricht und kein Metabolismus mehr stattfindet. Diese Grenze wurde in den hier durchgeführten Experimenten nicht erreicht. In der vorliegenden Studie waren die Zellen nach 24 h mit PolyP gesättigt. Zur gleichen Zeit ging der intrazelluläre ATP-Gehalt leicht zurück, da das ATP für die Herstellung von PolyP

die nötige Energie liefert. Sobald die PolyP Speicher voll waren, wurde erneut ATP aus ADP und PolyP gebildet, um die nötige Energie für andere metabolische Prozesse, wie Wachstum und Stickstofffixierung bereitzustellen. Sobald den Cyanobakterien wieder ausreichend Phosphor zur Verfügung stand, erhöhte sich auch die Nitrogenaseaktivität und es wurde verstärkt N_2 fixiert. Eine Substitution der Lipidzusammensetzung konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Vorrausichtlich war die Laufzeit der Experimente, mit bis zu zwei Wochen, zu kurz für diese metabolische Umstellung. Es kann angenommen werden, dass bei einer längeren Laufzeit, bzw. einer länger anhaltenden Phosphorunterversorgung die Membranen der Cyanobakterien umgebaut werden, um Phosphor bereitzustellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung der Fettsäuren von PG ändert. Weiterführende Untersuchungen könnten klären, welche Fettsäuren sich dabei genau ändern. Folglich könnte abgeleitet werden, welche Vorteile die Cyanobakterien daraus ziehen können. Es sollten des Weiteren Untersuchungen in Bezug auf den Gehalt an DNA und RNA unternommen werden, da diese Strukturen reich an Phosphor sind. Eine quantitative Methode zur Messung der DNA wurde in dieser Studie unternommen (s. Anhang), jedoch zeigten sich keine eindeutigen Reaktionen auf die Phosphorverfügbarkeit. Dasselbe gilt für die quantitative Untersuchung der RNA, was hier vor allem an der verwendeten Methodik (Orcinol-Aufschluss) lag. Um eine Aussage für diese beiden Komponenten treffen zu können, sollte in zukünftigen Studien zunächst verschiedene Extraktionsprotokolle getestet werden, um eine sichere Aussage zu gewährleisten. Des Weiteren sollten Untersuchungen mit ^{33}P unternommen werden, welches phosphorverarmten Cyanobakterien zugesetzt wird. Dadurch könnte man den direkten Einbau in die jeweiligen Zellstrukturen verfolgen.

Die in dieser Studie gewonnen Erkenntnisse sind ein wichtiger Schritt für das Verständnis der Physiologie der Cyanobakterien der Ostsee. Sie haben Strategien entwickelt, um dem Phosphormangel entgegenzuwirken, was sie zusätzlich zur Fähigkeit der Stickstofffixierung, dominant gegenüber anderen autotrophen Phytoplanktonarten macht.

Literaturverzeichnis

- Achbergerová L, Nahálka J. (2011). Polyphosphate - an ancient energy source and active metabolic regulator. *Microb Cell Fact* **10**: 63.
- Adams DG. (2000). Heterocyst formation in cyanobacteria. *Curr Opin Microbiol* **3**: 618–624.
- Aitchison PA, Butt VS. (1973). The relation between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella vulgaris*. *J Exp Bot* **24**: 497–510.
- Al-Hasan RH, Ali AM, Radwan SS. (1989). Effects of light and dark incubation on the lipid and fatty acid composition of marine cyanobacteria. *Microbiology* **135**: 865–872.
- Arnon DI. (1959). Conversion of light into chemical energy in photosynthesis. *Nature* **184**: 10–21.
- Aschar-Sobbi R, Abramov AY, Diao C, Kargacin ME, Kargacin GJ, French RJ, *et al.* (2008). High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach. *J Fluoresc* **18**: 859–66.
- Baxter M, Jensen T. (1980). A study of methods for in situ X-ray energy dispersive analysis of polyphosphate bodies in *Plectonema boryanum*. *Arch Microbiol* **126**: 213–215.
- Benning C. (2006). Membrane lipids in anoxygenic photosynthetic bacteria. In: *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, pp 83–101.
- Benning C, Beatty JT, Prince RC, Somerville CR. (1993). The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1561–1565.
- Bergman B, Gallon JR, Rai AN, Stal LJ. (1997). N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **19**: 139–185.
- Berman T. (2001). The role of DON and the effect of N:P ratios on occurrence of cyanobacterial blooms: Implications from the outgrowth of *Aphanizomenon* in Lake Kinneret. *Limnol Oceanogr* **46**: 443–447.
- Bhaya D, Schwarz R, Grossman AR. (2000). Molecular responses to environmental stress. *Ecol Cyanobacteria* 397–442.
- Bianchi TS, Engelhaupt E, Westman P, Andrén T, Rolff C, Elmgren R. (2000). Cyanobacterial blooms in the Baltic Sea: Natural or human-induced? *Limnol Oceanogr* **45**: 716–726.
- Björkman KM, Karl DM. (2001). A novel method for the measurement of dissolved adenosine and guanosine triphosphate in aquatic habitats: Applications to marine microbial ecology. *J Microbiol Methods* **47**: 159–167.
- Bligh EG, Dyer WJ. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911–917.
- Böhme H. (1998). Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. *Trends Plant Sci* **3**: 346–351.
- Bornet É, Flahault C. (1886). Revision des Nostocacées hétérocystées contenues dans les principaux herbiers de France (quatrième et dernier fragment). *Physiol Gen* **7**: 177–262.

- Boudière L, Michaud M, Petroutsos D, Rébeillé F, Falconet D, Bastien O, *et al.* (2014). Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1837**: 470–480.
- Brachet J, Jeener R. (1944). Recherches sur des particules cytoplasmiques de dimensions macromoléculaires riches en acide pentosenucléiques. 1. Propriétés générales ; relations avec les hydrolases, les hormones, les protéines de structure. Dr. W. Junk B.V. Publishers.
- Braun PD, Schulz-Vogt HN, Vogts A, Nausch M. (2018). Differences in the accumulation of phosphorus between vegetative cells and heterocysts in the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Sci Rep* **8**: 5651.
- Breus NA, Ryazanova LP, Dmitriev V V., Kulakovskaya T V., Kulaev IS. (2012). Accumulation of phosphate and polyphosphate by *Cryptococcus humicola* and *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of nitrogen. *FEMS Yeast Res* **12**: 617–624.
- Brock J, Schulz-Vogt HN. (2011). Sulfide induces phosphate release from polyphosphate in cultures of a marine *Beggiatoa* strain. *ISME J* **5**: 497–506.
- Brum JR, Steward GF, Karl DM. (2004). A novel method for the measurement of dissolved deoxyribonucleic acid in seawater. *Limnol Oceanogr Methods* **2**: 248–255.
- Capone DG. (2001). Marine nitrogen fixation: What's the fuss? *Curr Opin Microbiol* **4**: 341–348.
- Chapman D. (1975). Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Q Rev Biophys* **8**: 185–235.
- Chida J, Yamane K, Takei T, Kido H. (2012). An efficient extraction method for quantitation of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. *Anal Chim Acta* **727**: 8–12.
- Cohen Y, Jørgensen BB, Padan E, Shilo M. (1975). Sulphide-dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature* **257**: 489–492.
- Cole JA, Hughes DE. (1965). The metabolism of polyphosphates in *Chlorobium thiosulfatophilum*. *J Gen Microbiol* **38**: 65–72.
- Correll DL, Tolbert NE. (1962). Ribonucleic acid-polyphosphate from algae. I. Isolation & Physiology. *Plant Physiol* **37**: 627–636.
- Cotner JB, Makino W, Biddanda BA. (2006). Temperature affects stoichiometry and biochemical composition of *Escherichia coli*. *Microb Ecol* **52**: 26–33.
- Cumino AC, Marcozzi C, Barreiro R, Salerno GL. (2007). Carbon cycling in *Anabaena* sp. PCC 7120. Sucrose synthesis in the heterocysts and possible role in nitrogen fixation. *Plant Physiol* **143**: 1385–1397.
- Curatti L, Flores E, Salerno GL. (2002). Sucrose is involved in the diazotrophic metabolism of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *FEBS Lett* **513**: 175–178.
- Degerholm J, Gundersen K, Bergman B, Söderbäck E. (2006). Phosphorus-limited growth dynamics in two Baltic Sea cyanobacteria, *Nodularia* sp. and *Aphanizomenon* sp. *FEMS Microbiol Ecol* **58**: 323–332.
- Diaz JM, Ingall ED. (2010). Fluorometric quantification of natural inorganic polyphosphate. *Environ Sci Technol* **44**: 4665–4671.
- Diaz JM, Ingall ED, Benitez-Nelson CR, Paterson D, de Jonge MD, McNulty I, *et al.* (2008). Marine polyphosphate: A key player in geologic phosphorus sequestration. *Science* **320**: 652–655.

- van Dok W, Hart BT. (1996). Akinete differentiation in *Anabaena circinalis* (Cyanophyta). *J Phycol* **32**: 557–565.
- Eixler S, Karsten U, Selig U. (2006). Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxioiphyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. *Phycologia* **45**: 53–60.
- Elmgren R, Larsson U. (2001). Nitrogen and the Baltic Sea: managing nitrogen in relation to phosphorus. *Sci World J* **1 Suppl 2**: 371–377.
- Ernst A, Black T, Cai Y, Panoff J-M, Tiwari DN, Wolk CP. (1992). Synthesis of nitrogenase in mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 affected in heterocyst development or metabolism. *J Bacteriol* **174**: 6025–6032.
- Fay P. (1992). Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol Rev* **56**: 340–373.
- Fay P, Walsby AE. (1966). Metabolic activities of isolated heterocysts of the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Nature* **209**: 94–95.
- Feijoó C, Comerma M, Marcé R, García JC, Balayla D, Navarro E, et al. (2008). Influence of phosphorus and irradiance on phytoplanktonic chlorophyll-a concentration and phosphorus contents at a diel scale in a mediterranean reservoir. *Limnetica* **27**: 329–342.
- Finni T, Kononen K, Olsonen R, Wallström K. (2001). The history of cyanobacterial blooms in the Baltic Sea. In: Vol. 30. *Ambio*. Royal Swedish Academy of Sciences, pp 172–178.
- Funkey CP, Conley DJ, Reuss NS, Humborg C, Jilbert T, Slomp CP. (2014). Hypoxia sustains cyanobacteria blooms in the Baltic Sea. *Environ Sci Technol* **48**: 2598–2602.
- Gehring MM, Wannicke N. (2014). Climate change and regulation of hepatotoxin production in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **88**: 1–25.
- Geider RJ, La Roche J. (2002). Redfield revisited: Variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur J Phycol* **37**: 1–17.
- Golden JW, Yoon H-S. (2003). Heterocyst development in *Anabaena*. *Curr Opin Microbiol* **6**: 557–563.
- Gombos Z, Wada H, Murata N. (1994). The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: A mechanism of chilling tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8787–8791.
- Gombos Z, Wada H, Murata N. (1992). Unsaturation of fatty acids in membrane lipids enhances tolerance of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to low-temperature photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 9959–9963.
- Granéli LE, Wallström K, Larsson U, Granéli W, Elmgren R. (1990). Nutrient limitation of primary production in the Baltic Sea area. *Ambio* **19**.
- Grillo JF, Gibson J. (1979). Regulation of phosphate accumulation in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *J Bacteriol* **140**: 508–17.
- Grönlund L, Kononen K, Lahdes EO, Mäkelä K. (1996). Community development and modes of phosphorus utilization in a late summer ecosystem in the central Gulf of Finland, the Baltic Sea. *Hydrobiologia* **331**: 97–108.
- Grossman AR, Takahashi H. (2001). Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 163–210.

- Hagemann M, Möke F, Springer A, Westermann L, Frank M, Wasmund N, *et al.* (2019). Cyanobacterium *Nodularia spumigena* strain CCY9414 accumulates polyphosphate under long-term P-limiting conditions. *Aquat Microb Ecol* **82**: 265–274.
- Hansen HP, Koroleff F. (2007). Determination of nutrients. In: *Methods of Seawater Analysis: Third, Completely Revised and Extended Edition*. Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, pp 159–228.
- Harold FM. (1963). Accumulation of inorganic polyphosphate in *Aerobacter aerogenes*. I. Relationship to growth and nucleic acid synthesis. *J Bacteriol* **86**: 216–21.
- Harold FM. (1960). Accumulation of inorganic polyphosphate in mutants of *Neurospora crassa*. *BBA - Biochim Biophys Acta* **45**: 172–188.
- Harold FM. (1964). Enzymic and genetic control of polyphosphate accumulation in *Aerobacter aerogenes*. *J Gen Microbiol* **35**: 81–90.
- Haselkorn R. (1978). Heterocysts. *Annu Rev Plant Physiol* **29**: 319–44.
- HELCOM. (1997). Airborne pollution load to the Baltic Sea 1991–1995. Helsinki.
- HELCOM. (1988). Guidelines for the Baltic Monitoring Programme for the third stage: Biological determinands. Helsinki.
- HELCOM. (2017). Manual for marine monitoring in the COMBINE programme of HELCOM. *Man Mar Monit Comb Program HELCOM* **2017**: 1–423.
- HELCOM. (1998). Third Baltic Sea pollution load compilation. Helsinki.
- Hodson RE, Holm-Hansen O, Azam F. (1976). Improved methodology for ATP determination in marine environments. *Mar Biol* **34**: 143–149.
- Holm-Hansen O, Booth CR. (1966). The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnol Oceanogr* **11**: 510–519.
- Holz JC, Hoagland KD. (1999). Effects of phosphorus reduction on water quality: Comparison of alum-treated and untreated portions of a hypereutrophic lake. *Lake Reserv Manag* **15**: 70–82.
- Hübel H, Hübel M. (1980). Nitrogen fixation during blooms of *Nodularia* in coastal waters and backwaters of the Arkona Sea (Baltic Sea) in 1974. *Int Rev der gesamten Hydrobiol und Hydrogr* **65**: 793–808.
- Huber AL. (1986). Nitrogen fixation by *Nodularia spumigena* Mertens (Cyanobacteriaceae). 2: Laboratory studies. *Hydrobiologia* **133**: 193–202.
- Huflejt ME, Tremolieres A, Pineau B, Lang JK, Hatheway J, Packer L. (1990). Changes in membrane lipid composition during saline growth of the fresh water cyanobacterium *Synechococcus* 6311. *Plant Physiol* **94**: 1512–1521.
- Hupfer M, Gloess S, Grossart H-P. (2007). Polyphosphate-accumulating microorganisms in aquatic sediments. *Aquat Microb Ecol* **47**: 299–311.
- Janssen F, Neumann T, Schmidt M. (2004). Inter-annual variability in cyanobacteria blooms in the Baltic Sea controlled by wintertime hydrographic conditions. *Mar Ecol Prog Ser* **275**: 59–68.
- Johnson DL. (1971). Simultaneous determination of arsenate and phosphate in natural waters. *Environ Sci Technol* **5**: 411–414.

- Joyard J, Maréchal E, Miège C, Block MA, Dorne A-J, Douce R. (2006). Structure, distribution and biosynthesis of glycerolipids from higher plant chloroplasts. In: *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, pp 21–52.
- Kahru M, Savchuk OP, Elmgren R. (2007). Satellite measurements of cyanobacterial bloom frequency in the Baltic Sea: Interannual and spatial variability. *Mar Ecol Prog Ser* **343**: 15–23.
- Kanai R, Simonis W. (1968). Einbau von ^{32}P in verschiedene Phosphatfraktionen, besonders Polyphosphate, bei einzelligen Grünalgen (*Ankistrodesmus braunii*) im Licht und im Dunkeln. *Arch Mikrobiol* **62**: 56–71.
- Karl DM. (2000). Phosphorus, the staff of life. *Nature* **406**: 31–33.
- Karl DM, Björkman KM. (2002). Dynamics of DOP. In: *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. pp 249–366.
- Khomutov G, Fry I V., Huflejt ME, Packer L. (1990). Membrane lipid composition, fluidity, and surface charge changes in response to growth of the fresh water cyanobacterium *Synechococcus* 6311 under high salinity. *Arch Biochem Biophys* **277**: 263–267.
- Klawonn I, Bonaglia S, Brüchert V, Ploug H. (2015). Aerobic and anaerobic nitrogen transformation processes in N_2 -fixing cyanobacterial aggregates. *ISME J* **9**: 1456–1466.
- Knap AH, Michaels A, Close AR, Ducklow H, Dickson AG. (1996). Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) core measurements. *JGOFS Reoprt* **29**: 198.
- Kolzau S, Dolman AM, Voss M, Wiedner C. (2018). The response of nitrogen fixing cyanobacteria to a reduction in nitrogen loading. *Int Rev Hydrobiol* **103**: 5–14.
- Kononen K, Kuparinen J, Mäkelä K, Laanemets J, Pavelson J, Nömmann S. (1996). Initiation of cyanobacterial blooms in a frontal region at the entrance to the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Limnol Oceanogr* **41**: 98–112.
- Kononen K, Lahdes EO, Grönlund L. (1993). Physiological and community responses of summer plankton to nutrient manipulation in the Gulf of Finland (Baltic Sea) with special reference to phosphorus. *Sarsia* **78**: 243–253.
- Kornberg A, Kornberg SR, Simms ES. (1956). Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*. *BBA - Biochim Biophys Acta* **20**: 215–227.
- Kornberg SR. (1957). Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme from *Escherichia coli*. *BBA - Biochim Biophys Acta* **26**: 294–300.
- Kromkamp J. (1987). Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria. *New Zeal J Mar Freshw Res* **21**: 457–465.
- Kruse J, Abraham M, Amelung W, Baum C, Bol R, Kühn O, et al. (2015). Innovative methods in soil phosphorus research: A review. *J Plant Nutr Soil Sci* **178**: 43–88.
- Kuhl A. (1960). Die Biologie der kondensierten anorganischen Phosphate. In: *Ergebnisse der Biologie*. Vieweg+Teubner Verlag: Wiesbaden, pp 144–186.
- Kunimitsu K, Tomoharu S, Makoto M W, Fujio S, Hiroyasu I. (1993). Thioic O-acid ester in sulfolipid isolated from freshwater picoplankton cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab* **1169**: 39–45.
- Kuroda A, Ohtake H. (2000). Molecular analysis of polyphosphate accumulation in bacteria. *Biochemistry* **65**: 304–308.

- Laanemets J, Lilover MJ, Raudsepp U, Autio R, Vahtera E, Lips I, *et al.* (2006). A fuzzy logic model to describe the cyanobacteria *Nodularia spumigena* blooms in the Gulf of Finland, Baltic Sea. In: Vol. 554. *Hydrobiologia*. Kluwer Academic Publishers, pp 31–45.
- Langer S, Vogts A, Schulz-Vogt HN. (2018). Simultaneous visualization of enzymatic activity in the cytoplasm and at polyphosphate inclusions in *Beggiatoa* sp. strain 35Flor incubated with ¹⁸O-labeled water. *mSphere* **3**: e00489-18.
- Larsson U, Hajdu S, Walve J, Elmgren R. (2001). Baltic Sea nitrogen fixation estimated from the summer increase in upper mixed layer total nitrogen. *Limnol Oceanogr* **46**: 811–820.
- Lechevalier H, Lechevalier MP. (1988). Chemotaxonomic use of lipids. In: Vol. 1. *Microbial Lipids*. Academic Press, pp 869–902.
- Leppänen J-M, Niemi Å, Rinne I. (1988). Nitrogen fixation of cyanobacteria (blue-green algae) and the nitrogen cycle of the Baltic Sea. *Symbiosis* **6**: 181–194.
- Levine SN, Schindler DW. (1999). Influence of nitrogen to phosphorus supply ratios and physicochemical conditions on cyanobacteria and phytoplankton species composition in the Experimental Lakes Area, Canada. *Can J Fish Aquat Sci* **56**: 451–466.
- Liss E, Langen P. (1962). Experiments on polyphosphate overcompensation in yeast cells after phosphate deficiency. *Arch Mikrobiol* **41**: 383–92.
- Makino W, Cotner JB, Sterner RW, Elser JJ. (2003). Are bacteria more like plants or animals? Growth rate and resource dependence of bacterial C:N:P stoichiometry. *Funct Ecol* **17**: 121–130.
- Martín-Figueroa E, Navarro F, Florencio FJ. (2000). The GS-GOGAT pathway is not operative in the heterocysts. Cloning and expression of *glsF* gene from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett* **476**: 282–286.
- Martin P, Van Mooy BAS. (2013). Fluorometric quantification of polyphosphate in environmental plankton samples: Extraction protocols, matrix effects, and nucleic acid interference. *Appl Environ Microbiol* **79**: 273–281.
- Melvasalo T, Niemi Å, Niemistö L, Rinne I. (1983). On the importance of the nitrogen fixation in the Baltic Sea ecosystem. *Symp Ecol Investig Balt Sea Environ* 16–19.
- Mills MM, Ridame C, Davey M, La Roche J, Geider RJ. (2004). Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic. *Nature* **429**: 292–294.
- Moisander PH, Paerl HW. (2000). Growth, primary productivity, and nitrogen fixation potential of *Nodularia* spp. (Cyanophyceae) in water from a subtropical estuary in the United States. *J Phycol* **36**: 645–658.
- Moisander PH, Steppe TF, Hall NS, Kuparinen J, Paerl HW. (2003). Variability in nitrogen and phosphorus limitation for Baltic Sea phytoplankton during nitrogen-fixing cyanobacterial blooms. *Mar Ecol Prog Ser* **262**: 81–95.
- Molitor V, Trnka M, Erber W, Steffan I, Rivière ME, Arrio B, *et al.* (1990). Impact of salt adaptation on esterified fatty acids and cytochrome oxidase in plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Arch Microbiol* **154**: 112–119.
- Möller L, Laas P, Rogge A, Goetz F, Bahlo R, Leipe T, *et al.* (2019). *Sulfurimonas* subgroup GD17 cells accumulate polyphosphate under fluctuating redox conditions in the Baltic Sea: possible implications for their ecology. *ISME J* **13**: 482–493.
- Montoya JP, Voss M, Kähler P, Capone DG. (1996). A simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N₂ fixation. *Appl Environ Microbiol* **62**: 986–993.

- Van Mooy BAS, Devol AH. (2008). Assessing nutrient limitation of *Prochlorococcus* in the North Pacific subtropical gyre by using an RNA capture method. *Limnol Oceanogr* **53**: 78–88.
- Van Mooy BAS, Fredricks HF, Pedler BE, Dyhrman ST, Karl DM, Koblížek M, *et al.* (2009). Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* **458**: 69–72.
- Van Mooy BAS, Moutin T, Duhamel S, Rimmelin P, Van Wambeke F. (2008). Phospholipid synthesis rates in the eastern subtropical South Pacific Ocean. *Biogeosciences* **5**: 133–139.
- Van Mooy BAS, Rocap G, Fredricks HF, Evans CT, Devol AH. (2006). Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8607–8612.
- Moutin T, Karl DM, Duhamel S, Rimmelin P, Raimbault P, van Mooy BAS, *et al.* (2008). Phosphate availability and the ultimate control of new nitrogen input by nitrogen fixation in the tropical Pacific Ocean. *Biogeosciences Discuss* **5**: 95–109.
- Murata N, Nishida I. (1987). Lipids of blue-green algae (cyanobacteria). In: *Lipids: Structure and Function*. Academic Press, pp 315–347.
- Muro-Pastor AM, Valladares A, Flores E, Herrero A. (2002). Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development. *Mol Microbiol* **44**: 1377–1385.
- Murphy J, Riley JP. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* **27**: 31–36.
- Naoki S, Norio M. (1982a). Lipid biosynthesis in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*: I. Lipid classes. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab* **710**: 271–278.
- Naoki S, Norio M. (1982b). Lipid biosynthesis in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*. II. Fatty acids and lipid molecular species. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab* **710**: 279–289.
- Nausch M, Nausch G. (2004). Bacterial utilization of phosphorus pools after nitrogen and carbon amendment and its relation to alkaline phosphatase activity. *Aquat Microb Ecol* **37**: 237–245.
- Nausch M, Nausch G, Lass HU, Mohrholz V, Nagel K, Siegel H, *et al.* (2009). Phosphorus input by upwelling in the eastern Gotland Basin (Baltic Sea) in summer and its effects on filamentous cyanobacteria. *Estuar Coast Shelf Sci* **83**: 434–442.
- Nausch M, Nausch G, Mohrholz V, Siegel H, Wasmund N. (2012). Is growth of filamentous cyanobacteria supported by phosphate uptake below the thermocline? *Estuar Coast Shelf Sci* **99**: 50–60.
- Nausch M, Nausch G, Wasmund N, Nagel K. (2008). Phosphorus pool variations and their relation to cyanobacteria development in the Baltic Sea: A three-year study. *J Mar Syst* **71**: 99–111.
- Nichols BW, Wood BJB. (1968). New glycolipid specific to nitrogen-fixing blue-green algae. *Nature* **217**: 767–768.
- Nicolaisen K, Mariscal V, Bredemeier R, Pernil R, Moslavac S, López-Igual R, *et al.* (2009). The outer membrane of a heterocyst-forming cyanobacterium is a permeability barrier for uptake of metabolites that are exchanged between cells. *Mol Microbiol* **74**: 58–70.
- Niemi Å. (1979). Blue-green algal blooms and N:P ratio in the Baltic Sea. *Acta Bot Fenn* **110**: 57–61.

- Nocek B, Kochinyan S, Proudfoot M, Brown G, Evdokimova E, Osipiuk J, *et al.* (2008). Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 17730–17735.
- Ohlndieck U, Stühr A, Siegmund H. (2000). Nitrogen fixation by diazotrophic cyanobacteria in the Baltic Sea and transfer of the newly fixed nitrogen to picoplankton organisms. *J Mar Syst* **25**: 213–219.
- Olenina I, Hajdu S, Andersson A, Edler L, Wasmund N, Busch S, *et al.* (2006). Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea. *Balt Sea Environ Proc* 144pp.
- Orchard ED, Benitez-Nelson CR, Pellechia PJ, Lomas MW, Dyhrman ST. (2010). Polyphosphate in *Trichodesmium* from the low-phosphorus Sargasso Sea. *Limnol Oceanogr* **55**: 2161–2169.
- Paasche E, Erga SR. (1988). Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton in the inner Oslofjord (Norway). *Sarsia* **73**: 229–243.
- Perakis SS, Welch EB, Jacoby JM. (1996). Sediment-to-water blue-green algal recruitment in response to alum and environmental factors. *Hydrobiologia* **318**: 165–177.
- Pick U, Rental M, Chitlaru E, Weiss M. (1990). Polyphosphate-hydrolysis - a protective mechanism against alkaline stress? *FEBS Lett* **274**: 15–18.
- Pick U, Weiss M. (1991). Polyphosphate hydrolysis within acidic vacuoles in response to amine-induced alkaline stress in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* **97**: 1234–1240.
- Piorreck M, Pohl P. (1984). Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids in green and blue-green algae during one growth phase. *Phytochemistry* **23**: 217–223.
- Ploug H, Adam B, Musat N, Kalvelage T, Lavik G, Wolf-Gladrow D, *et al.* (2011). Carbon, nitrogen and O₂ fluxes associated with the cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea. *ISME J* **5**: 1549–1558.
- Polerecky L, Adam B, Milucka J, Musat N, Vagner T, Kuypers MMM. (2012). Look@NanoSIMS - a tool for the analysis of nanoSIMS data in environmental microbiology. *Environ Microbiol* **14**: 1009–1023.
- Pollingher U, Hadas O, Yacobi YZ, Zohary T, Berman T. (1998). *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) in Lake Kinneret, Israel. *J Plankton Res* **20**: 1321–1339.
- Poutanen E-L, Nikkilä K. (2001). Carotenoid pigments as tracers of cyanobacterial blooms in recent and post-glacial sediments of the Baltic Sea. In: Vol. 30. *Ambio*. Royal Swedish Academy of Sciences, pp 179–183.
- Rao NN, Gómez-García MR, Kornberg A. (2009). Inorganic polyphosphate: Essential for growth and survival. *Annu Rev Biochem* **78**: 605–647.
- Redfield AC. (1934). On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton. University Press of Liverpool: Liverpool.
- Redfield AC, Ketchum BH, Richards FA. (1963). The influence of organisms on the composition of sea-water. Wiley Interscience: New York.
- Reinfelder JR. (2012). Carbon dioxide regulation of nitrogen and phosphorus in four species of marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser* **466**: 57–67.
- Resnick SM, Zehnder AJB. (2000). In vitro ATP regeneration from polyphosphate and AMP by polyphosphate:AMP phosphotransferase and adenylate kinase from *Acinetobacter johnsonii* 210A. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2045–2051.

- Roleda MY, Mohlin M, Pattanaik B, Wulff A. (2008). Photosynthetic response of *Nodularia spumigena* to UV and photosynthetically active radiation depends on nutrient (N and P) availability. *FEMS Microbiol Ecol* **66**: 230–242.
- Rydin E, Hyenstrand P, Gunnerhed M, Blomqvist P. (2002). Nutrient limitation of cyanobacterial blooms: an enclosure experiment from the coastal zone of the NW Baltic proper. *Mar Ecol Prog Ser* **239**: 31–36.
- Said HA. (2009). Changes in levels of cellular constituents of *Dunaliella parva* associated with inorganic phosphate depletion. *Middle-East J Sci Res* **4**: 94–99.
- Sallal A-K, Ghannoum MA, Al-Hasan RH, Nimer NA, Radwan SS. (1987). Lanosterol and diacylglycerophosphocholines in lipids from whole cells and thylakoids of the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii*. *Arch Microbiol* **148**: 1–7.
- Sato N. (1994). Effect of exogenous glucose on the accumulation of monoglucosyl diacylglycerol in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol Biochem* **32**: 121–126.
- Sato N. (2015). Is monoglucosyldiacylglycerol a precursor to monogalactosyldiacylglycerol in all cyanobacteria? *Plant Cell Physiol* **56**: 1890–1899.
- Schindler DW. (2014). Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science* **195**: 260–262.
- Schmidt G, Hecht L, Thannhauser SJ. (1946). The enzymatic formation and the accumulation of large amounts of a metaphosphate in bakers' yeast under certain conditions. *J Biol Chem* **166**: 775.
- Schoffelen NJ, Mohr W, Ferdelman TG, Littmann S, Duerschlag J, Zubkov M V., et al. (2018). Single-cell imaging of phosphorus uptake shows that key harmful algae rely on different phosphorus sources for growth. *Sci Rep* **8**: 17182.
- Schulz-Vogt HN, Pollehne F, Jürgens K, Arz HW, Beier S, Bahlo R, et al. (2019). Effect of large magnetotactic bacteria with polyphosphate inclusions on the phosphate profile of the suboxic zone in the Black Sea. *ISME J* **13**: 1198–1208.
- Sellner KG. (1997). Physiology, ecology, and toxic properties of marine cyanobacteria blooms. *Limnol Oceanogr* **42**: 1089–1104.
- Siebers M, Brands M, Wewer V, Duan Y, Hölzl G, Dörmann P. (2016). Lipids in plant-microbe interactions. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1861**: 1379–1395.
- Sivonen K, Kononen K, Esala A-L, Niemelä SI. (1989). Toxicity and isolation of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* from the southern Baltic Sea in 1986. *Hydrobiologia* **185**: 3–8.
- Smith S V. (1984). Phosphorus versus nitrogen limitation in the marine-environment. *Limnol Oceanogr* **29**: 1149–1160.
- Soriente A, Sodano G, Cambacorta A, Trincone A. (1992). Structure of the 'Heterocyst Glycolipids' of the marine cyanobacterium *Nodularia harveyana*. *Tetrahedron* **48**: 5375–5384.
- Stal LJ, Staal M, Villbrandt M. (1999). Nutrient control of cyanobacterial blooms in the Baltic Sea. *Aquat Microb Ecol* **18**: 165–173.
- Stal LJ, Walsby AE. (2000). Photosynthesis and nitrogen fixation in a cyanobacterial bloom in the Baltic Sea. *Eur J Phycol* **35**: 97–108.
- Struck U, Pollehne F, Bauerfeind E, von Bodungen B. (2004). Sources of nitrogen for the vertical particle flux in the Gotland Sea (Baltic Proper) - Results from sediment trap studies. *J Mar Syst* **45**: 91–101.

- Sukenik A, Kaplan-Levy RN, Welch JM, Post AF. (2012). Massive multiplication of genome and ribosomes in dormant cells (akinetes) of *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria). *ISME J* **6**: 670–679.
- Šulčius S, Alzbutas G, Kvederavičiute K, Koreiviene J, Zakrys L, Lubys A, *et al.* (2015). Draft genome sequence of the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* strain 2012/KM1/D3, isolated from the Curonian Lagoon (Baltic Sea). *Genome Announc* **3**: e01392-14.
- Svedén JB, Adam B, Walve J, Nahar N, Musat N, Lavik G, *et al.* (2015). High cell-specific rates of nitrogen and carbon fixation by the cyanobacterium *Aphanizomenon* sp. at low temperatures in the Baltic Sea Olson J (ed). *FEMS Microbiol Ecol* **91**: fiv131.
- Tasaka Y, Gombos Z, Nishiyama Y, Mohanty P, Ohba T, Ohki K, *et al.* (1996). Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: Evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *EMBO J* **15**: 6416–6425.
- Teikari JE, Fewer DP, Shrestha R, Hou S, Leikoski N, Mäkelä M, *et al.* (2018). Strains of the toxic and bloom-forming *Nodularia spumigena* (cyanobacteria) can degrade methylphosphonate and release methane. *ISME J* **12**: 1619–1630.
- Theodorou ME, Elrifi IR, Turpin DH, Plaxton WC. (1991). Effects of phosphorus limitation on respiratory metabolism in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol* **95**: 1089–1095.
- Thomas J, Meeks JC, Wolk CP, Shaffer PW, Austin SM, Chien W-S. (1977). Formation of glutamine from [¹³N]ammonia, [¹³N]dinitrogen, and [¹⁴C]glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrica*. *J Bacteriol* **129**: 1545–1555.
- Unger J, Endres S, Wannicke N, Engel A, Voss M, Nausch G, *et al.* (2013). Response of *Nodularia spumigena* to pCO₂-Part 3: Turnover of phosphorus compounds. *Biogeosciences* **10**: 1483–1499.
- Vadstein O. (1998). Evaluation of competitive ability of two heterotrophic planktonic bacteria under phosphorus limitation. *Aquat Microb Ecol* **14**: 119–127.
- Vahtera E, Conley DJ, Gustafsson BG, Kuosa H, Pitkänen H, Savchuk OP, *et al.* (2007a). Internal ecosystem feedbacks enhance nitrogen-fixing cyanobacteria blooms and complicate management in the Baltic Sea. *Ambio* **36**: 186–194.
- Vahtera E, Laamanen M, Rintala JM. (2007b). Use of different phosphorus sources by the bloom-forming cyanobacteria *Aphanizomenon flos-aquae* and *Nodularia spumigena*. *Aquat Microb Ecol* **46**: 225–237.
- Vahtera E, Laanemets J, Pavelson J, Huttunen M, Kononen K. (2005). Effect of upwelling on the pelagic environment and bloom-forming cyanobacteria in the western Gulf of Finland, Baltic Sea. *J Mar Syst* **58**: 67–82.
- Voß B, Bolhuis H, Fewer DP, Kopf M, Möke F, Haas F, *et al.* (2013). Insights into the physiology and ecology of the brackish-water-adapted cyanobacterium *Nodularia spumigena* CCY9414 based on a genome-transcriptome analysis Janssen PJ (ed). *PLoS One* **8**: e60224.
- Voss M, Emeis KC, Hille S, Neumann T, Dippner JW. (2005). Nitrogen cycle of the Baltic Sea from an isotopic perspective. *Global Biogeochem Cycles* **19**: 1–15.
- Wacklin P, Hoffmann L, Komárek J. (2009). Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea* **9**: 59–64.
- Wada H, Gombos Z, Murata N. (1990). Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature* **347**: 200–203.

- Wada H, Gombos Z, Sakamoto T, Murata N. (1992). Genetic manipulation of the extent of desaturation of fatty acids in membrane lipids in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant Cell Physiol* **33**: 535–540.
- Wada H, Murata N. (2006). Membrane lipids in cyanobacteria. In: *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, pp 65–81.
- Wada H, Murata N. (1990). Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiol* **92**: 1062–1069.
- Walve J, Larsson U. (2007). Blooms of Baltic Sea *Aphanizomenon* sp. (cyanobacteria) collapse after internal phosphorus depletion. *Aquat Microb Ecol* **49**: 57–69.
- Walve J, Larsson U. (2010). Seasonal changes in Baltic Sea seston stoichiometry: The influence of diazotrophic cyanobacteria. *Mar Ecol Prog Ser* **407**: 13–25.
- Wang H, Sivonen K, Rouhiainen L, Fewer DP, Lyra C, Rantala-Ylinen A, *et al.* (2012). Genome-derived insights into the biology of the hepatotoxic bloom-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 90. *BMC Genomics* **13**: 613.
- Wannicke N, Endres S, Engel A, Grossart H-P, Nausch M, Unger J, *et al.* (2012). Response of *Nodularia spumigena* to $p\text{CO}_2$ -Part 1: Growth, production and nitrogen cycling. *Biogeosciences* **9**: 2973–2988.
- Wannicke N, Korth F, Liskow I, Voss M. (2013). Incorporation of diazotrophic fixed N_2 by mesozooplankton - Case studies in the southern Baltic Sea. *J Mar Syst* **117–118**: 1–13.
- Wasmund N. (1997). Occurrence of cyanobacterial blooms in the Baltic Sea in relation to environmental conditions. *Int Rev der gesamten Hydrobiol und Hydrogr* **82**: 169–184.
- Wasmund N, Nausch G, Schneider B, Nagel K, Voss M. (2005). Comparison of nitrogen fixation rates determined with different methods: A study in the Baltic Proper. *Mar Ecol Prog Ser* **297**: 23–31.
- Wasmund N, Voss M, Lochte K. (2001). Evidence of nitrogen fixation by non-heterocystous cyanobacteria in the Baltic Sea and re-calculation of a budget of nitrogen fixation. *Mar Ecol Prog Ser* **214**: 1–14.
- Wiame J-M. (1947). Étude d'une substance polyphosphorée, basophile et métachromatique chez les levures. *BBA - Biochim Biophys Acta* **1**: 234–255.
- Willén T. (1962). Studies on the phytoplankton of some lakes connected with or recently isolated from the Baltic. *Oikos* **13**: 169.
- Wintermans JFGM. (1955). Polyphosphate formation in *Chlorella* in relation to photosynthesis. <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/525561> (Accessed July 26, 2019).
- Wolk CP. (1968). Movement of carbon from vegetative cells to heterocysts in *Anabaena cylindrica*. *J Bacteriol* **96**: 2138–43.
- Wolk CP, Austin SM, Bortins J, Galonsky A. (1974). Autoradiographic localization of ^{13}N after fixation of ^{13}N -labeled nitrogen gas by a heterocyst-forming blue-green alga. *J Cell Biol* **61**: 440–453.
- Wolk CP, Ernst A, Elhai J. (1994). Heterocyst metabolism and development. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Springer Netherlands: Dordrecht, pp 769–823.
- Wolk CP, Shaffer PW. (1976). Heterotrophic micro- and macrocultures of a nitrogen-Fixing Cyanobacterium. *Arch Microbiol* **110**: 145–147.
- Wu J, Sunda W, Boyle EA, Karl DM. (2000). Phosphate depletion in the western North Atlantic Ocean. *Science* **289**: 759–762.

Yusoff FM, McNabb CD. (1997). The effects of phosphorus and nitrogen on phytoplankton dominance in tropical fish ponds. *Aquac Res* **28**: 591–597.

Zehr JP, Bench SR, Carter BJ, Hewson I, Niazi F, Shi T, *et al.* (2008). Globally distributed uncultivated oceanic N₂-fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem II. *Science* **322**: 1110–1112.

Zillé L, Conley DJ. (2010). Hypoxia and cyanobacteria blooms - Are they really natural features of the late Holocene history of the Baltic Sea? *Biogeosciences* **7**: 2567–2580.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Betreuerin **Monika Nausch** danken. Sie gab mir die Chance an diesem spannenden und für mich zuvor unbekanntem Thema zu arbeiten. Ihre Tür stand für mich jederzeit bei Fragen offen. Danke für die vielen Ratschläge und die hilfreichen Anmerkungen.

Heide Schulz-Vogt möchte ich dafür danken, dass sie mich vor über 5 Jahren mit offenen Armen ans IOW geholt hat. Ich habe mich in ihrer Arbeitsgruppe sofort wohlfühlt, so dass sie auch meine Co-Betreuerin wurde. Ohne sie hätte ich wohl keine Doktorarbeit mehr angefangen. Danke für die ehrliche und konstruktive Kritik in all der Zeit.

Einen riesen Dank gebührt **Christin Laudan**, die über die Jahre eine meiner engsten Freundinnen wurde. Danke für die gemeinsame Zeit auf See, den Nächten im Labor und das du immer für mich da warst, auch wenn es mal nicht so richtig lief.

Vielen Dank auch an **Carmen Esser**, die im Laufe der Doktorarbeit in unsere Arbeitsgruppe kam und deren Arbeitseifer, Energie und Fröhlichkeit ansteckend war.

Bei **Jan Henkel** möchte ich mich besonders für sein stets offenes Ohr in all den Jahren bedanken und dass er mir den Einstieg am IOW leichtgemacht hat. Vielen Dank auch für die Ratschläge, Tipps und Tricks bei Textformatierungen und das dein Ehrgeiz ansteckend ist.

Vielen Dank an alle, die ihren Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben und mir Methoden und Geräte erklärt und bei der Durchführung geholfen haben: **Meike Siebers, Günter Nausch, Angela Vogts, Maren Voß, Christian Burmeister, Susanne Busch, Iris Liskow, Susanne Schöne, Annett Grützmüller, Frank Pohl, Evelyn Bolzmann, Rainer Bahlo, Jana Woelk** und **Ronny Baaske**.

Danke an **René, Lars, Kati, Franzi K., Mercè, Lina, Mirco, Simon, Sarah, Laura, Sophie, Sonja, Christian S., Christian M., Falk, Judith, Janine, NV, Simeon, Sara, Lisa, Franzi B., Brittan, Juliana, Miguel, Elvita, Dandan, Alex, Dalila, Sandra, Solveig, Bodo** sowie an alle, die ich hier vergessen habe... Ihr habt die letzten Jahre zu einer unvergesslichen Zeit für mich gemacht. Danke auch für die vielen schönen Pausen und Gespräche mit euch.

Ein großes Dankeschön auch an die **Crew** der Fahrt M-117 des FS „**Meteor**“ sowie der **Crew** der „**Rosenort**“.

Des Weiteren möchte ich der **Forschungsstiftung Ostsee** danken, die das Projekt, in dem diese Arbeit entstanden ist, gefördert hat. Ein weiterer Dank gilt dem **Leibniz-WissenschaftsCampus Phosphorforschung Rostock**, in dem dieses Projekt angesiedelt war und den noch nicht genannten Mitgliedern meines Thesis-Komitees: **Ulrich Bathmann, Thomas Leipe** und **Frieder Schauer**.

Zu guter Letzt möchte ich meinen **Freunden** und meiner **Familie**, vor allem meinen **Eltern**, danke, die die ganze Zeit hinter mir standen. Der größte Dank gilt meiner Frau **Franziska Braun**, die mir vor allem in den letzten Wochen den Rücken freigehalten hat, die mich aufbaute, wenn ich am Boden war, immer an mich glaubte und sich stundenlang akribisch durch meine vielen Zeilen ackerte. Danke auch an unseren **Krümel**, du warst der Grund, warum ich mir in den letzten Monaten die Nächte um die Ohren geschlagen habe, um diese Arbeit zu beenden, bevor du in unser Leben trittst.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation zum Thema:

Phosphatakkumulation in diazotrophen, filamentösen Cyanobakterien der Ostsee

selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem Fall durch Angaben der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Rostock, 22.10.2019

Philipp Braun

Anhang

DNA Extraktion

Nachfolgend wird, die in dieser Arbeit verwendete Methode der DNA Extraktion beschrieben. Die aus dieser Extraktion erzielten Ergebnisse gaben über die Phosphorakkumulation keine Aufschlüsse und wurden daher nicht weiter betrachtet.

Der Nachweis und die Messung des Gehalts an DNA wurde mittels SYBR Green (Brum *et al.*, 2004) durchgeführt. Die während der Experimente genommenen und anschließend weggefrorenen Proben wurden aufgetaut und in neue 2 mL Eppendorf Low-Bind Tubes überführt. Je Gefäß wurden drei 2 mm und drei 3 mm Zirkoniumperlen hinzugegeben, sowie 500 µL eines 1:1 Phenol/Chloroform Mixes und 500 µL Natriumlaurylsulfat (SDS) als Extraktionspuffer hinzu pipettiert. Die Gefäße wurden fest verschlossen und für 3 min gevortext. Anschließend wurden die Proben für 3 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der komplette Überstand wurde abgenommen und in ein neues 2 mL Eppendorf Low-Bind Gefäß überführt. In das erste Gefäß wurde abermals 500 µL eines Phenol/Chloroform Mixes und 500 µL Extraktionspuffer hinzu pipettiert, die Gefäße fest verschlossen und für 3 min gevortext. Anschließend wurden die Proben wieder für 3 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der komplette Überstand wurde abgenommen und mit dem vom ersten Durchgang vereinigt. Die Proben wurden nun bei 4 °C und 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues 2 mL Low-Bind Tube überführt. Das selbe Volumen, dass abgenommen wurde, wurde in Form von Phenol (pH-Wert 7,5) zur wässrigen Phase hinzugegeben, geschüttelt und bei 4 °C und 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde wieder abgenommen und in ein neues Low-Bind Gefäß überführt. Wieder wurde das selbe Volumen was abgenommen wurde in Form von Phenol zu der abgenommenen, wässrigen Phase hinzugegeben, geschüttelt und bei 4 °C bei 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgezogen und in ein neues Low-Bind Tube überführt. Zu der wässrigen Phase wurden 2,6 x das Volumen welches abgezogen wurde in Form des Fällungsmixes hinzugefügt, sowie 1,5 µL Glykogen um die Fällung zu verbessern. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20 °C. Am nächsten Tag wurden die Proben auf Eis aufgetaut und 40 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. 1 mL

eiskaltes 70 %iges Ethanol wurden zum Pellet hinzu pipettiert und dann für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vollständig abgezogen und verworfen. 750 µL eiskaltes 70 %iges Ethanol wurden nun hinzugefügt und wieder für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Unterm Abzug wurde gewartet bis das restliche Ethanol verdampft war. Zu den Pellets wurden nun je 100 µL 5 mM TRIS-Puffer (pH-Wert 8) hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt, bis das Pellet sich gelöst hatte. Danach wurden je 190 µL der Probe mit 10 µL SYBR Green I versetzt und am TECAN Plattenreader mittels Fluoreszenzmessung gemessen. Auf jeder Platte wurde eine Standardreihe mit einem internen Standard mitlaufen gelassen.

Tabellen der C:N:P Stöchiometrie

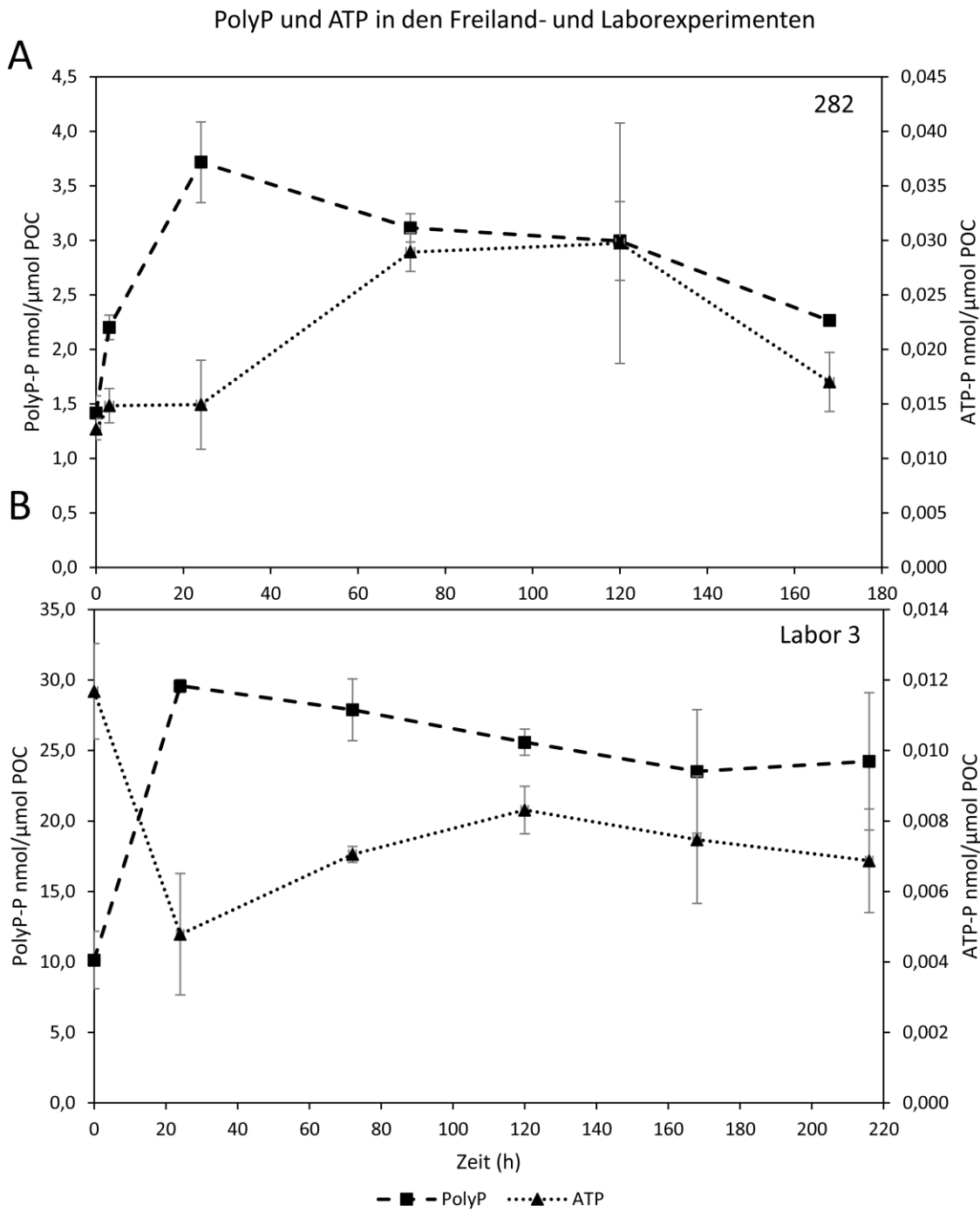
Tabelle 16) Änderung der C:N:P Stöchiometrie in den Freilandexperimenten.

Zeit (h)	0			24			72			120			168		
Station	C	N	P	C	N	P	C	N	P	C	N	P	C	N	P
213	128	20	1	132	22	1	156	19	1	140	15	1	141	35	1
245	284	16	1	154	21	1	149	19	1	187	15	1	234	23	1
282	327	49	1	176	27	1	191	25	1	177	25	1	187	27	1

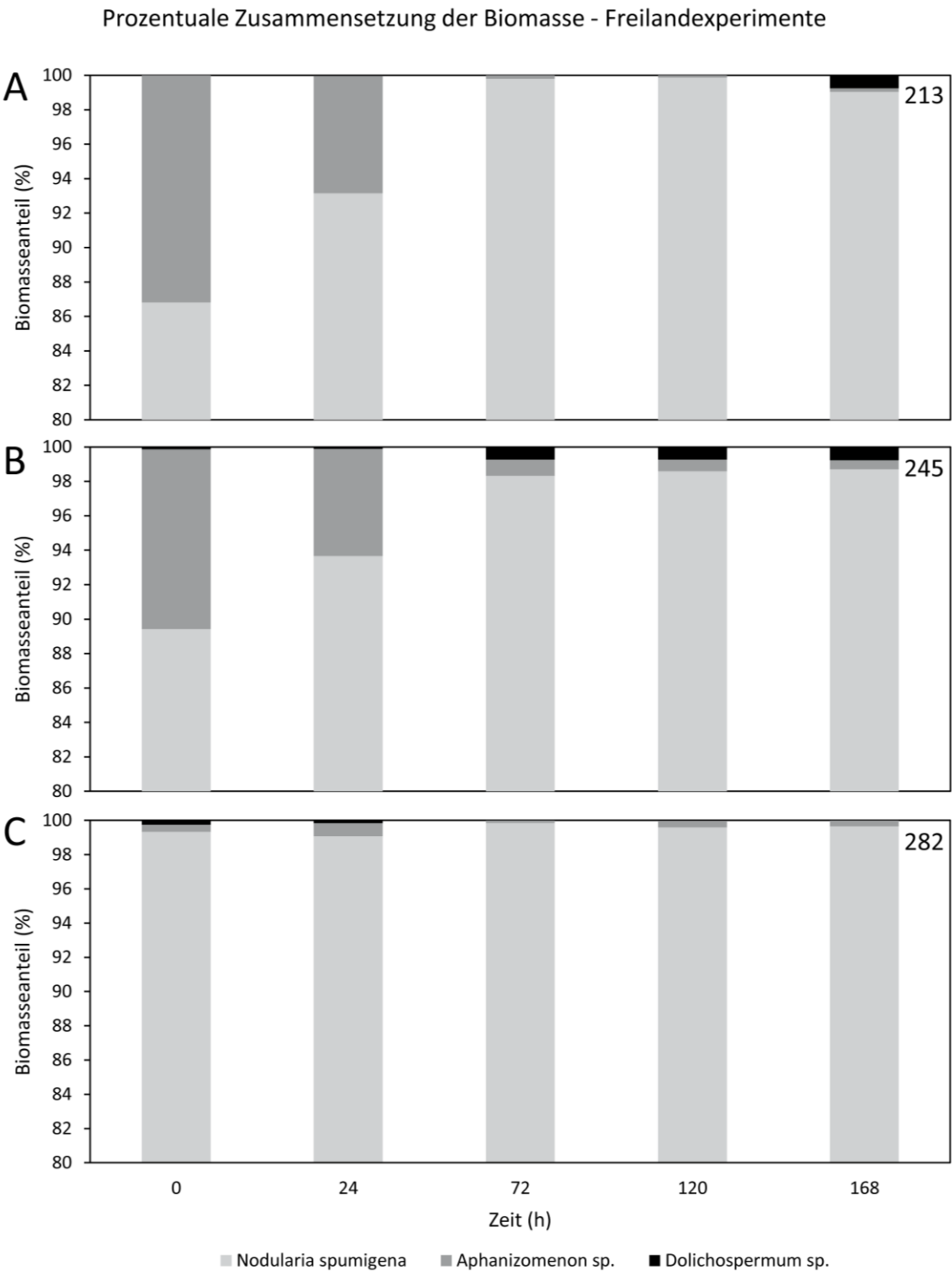
Tabelle 17) Änderung der C:N:P Stöchiometrie in den Laborexperimenten.

Zeit (h)	0			24			72			120			168			216			264			312			360		
Experiment	C	N	P	C	N	P	C	N	P	C	N	P	C	N	P	C	N	P	C	N	P	C	N	P	C	N	P
Labor 1	56	7	1	27	3	1	46	6	1	32	3	1	39	5	1	48	7	1	46	7	1	30	4	1	26	4	1
Labor 2	91	6	1	69	4	1	78	6	1	64	10	1	64	10	1	62	10	1									
Labor 3	124	15	1	48	6	1	44	6	1	54	9	1	53	9	1	55	8	1									
Kontrolle				156	18	1	203	25	1	241	41	1	252	40	1	359	56	1									

Zusammenhang PolyP und ATP am Beispiel zweier Experimente

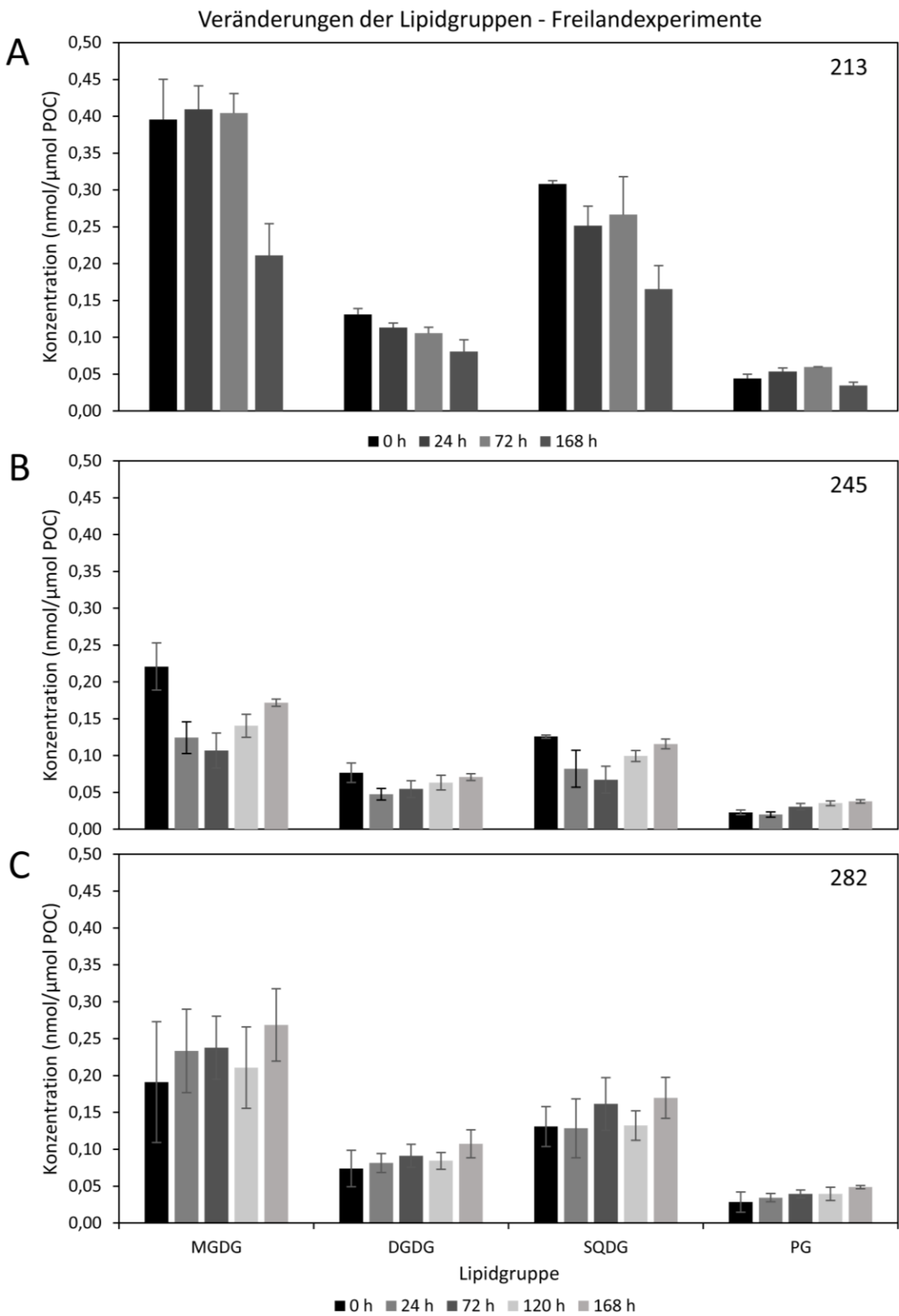


Prozentuale Zusammensetzung der Biomasse in den Freilandexperimenten



Lipidgehalte in den Freilandexperimenten

An Station 213 blieb der Gehalt von MGDG in den ersten 72 h konstant um $0,40 \pm 0,05$ nmol/ μ mol POC. Nach 168 h wurde ein deutlicher Rückgang auf $0,21 \pm 0,04$ nmol/ μ mol POC beobachtet. DGDG nahm über die Experimentlaufzeit kontinuierlich von $0,13 \pm 0,01$ auf $0,08 \pm 0,02$ nmol/ μ mol POC am Ende des Experiments ab. Der Gehalt an SQDG ging von $0,31 \pm 0,01$ auf $0,17 \pm 0,03$ nmol/ μ mol POC zurück. Dagegen stieg der von PG innerhalb von 72 h von $0,04 \pm 0,01$ auf $0,06 \pm 0,01$ nmol/ μ mol POC, bevor ein Rückgang auf $0,03 \pm 0,01$ nmol/ μ mol POC nach 168 h zu verzeichnen war. Bei den Experimenten an Station 245 stieg der Gehalt von MGDG ab Inkubationsbeginn von $0,19 \pm 0,08$ nmol/ μ mol POC leicht an und betrug nach 168 h $0,27 \pm 0,05$ nmol/ μ mol POC. DGDG stieg im selben Zeitraum von $0,07 \pm 0,02$ auf $0,11 \pm 0,02$ nmol/ μ mol POC und SQDG von $0,13 \pm 0,03$ auf $0,17 \pm 0,03$ nmol/ μ mol POC. Ein ähnlicher Verlauf konnte für PG gemessen werden, hier stieg der Gehalt von $0,03 \pm 0,01$ auf $0,05 \pm 0,01$ nmol/ μ mol POC. Die Änderungen im Gehalt von MGDG, DGDG und SQDG waren bei den Experimenten an Station 282 ähnlich wie an Station 245. Der Gehalt von MGDG sank innerhalb der ersten 72 h von $0,22 \pm 0,03$ auf $0,11 \pm 0,02$ nmol/ μ mol POC und stieg danach auf $0,17 \pm 0,01$ nmol/ μ mol POC (168 h). Bei DGDG sank der Gehalt von $0,08 \pm 0,03$ auf $0,05 \pm 0,01$ nmol/ μ mol POC und stieg wieder auf $0,07 \pm 0,01$ nmol/ μ mol POC. Der Gehalt von SQDG sank von $0,13 \pm 0,01$ nmol/ μ mol POC auf $0,07 \pm 0,02$ nmol/ μ mol POC und nahm danach bis zum Ende des Experiments wieder zu, wo ein Gehalt von $0,12 \pm 0,01$ nmol/ μ mol POC gemessen wurde. PG zeigte einen anderen Verlauf als die anderen Lipidgruppen. Hier verdoppelte sich der Gehalt im Laufe des Experiments von $0,02 \pm 0,01$ nmol/ μ mol POC auf $0,04 \pm 0,01$ nmol/ μ mol POC.



Lipidgehalte in den Laborexperimenten

Im 1. Laborexperiment stieg der Gehalt an MGDG von $0,38 \pm 0,25$ nmol/ μ mol POC innerhalb des Experimentierzeitraums auf $0,92 \pm 0,09$ nmol/ μ mol POC, was einer Zunahme von 142 % entsprach. Der Gehalt an DGDG nahm im selben Zeitraum um 167 %, von $0,06 \pm 0,02$ auf $0,16 \pm 0,02$ nmol/ μ mol POC zu. Beim SQDG konnte ein Zuwachs von $0,11 \pm 0,04$ nmol/ μ mol POC bei Inkubationsbeginn, auf $0,36 \pm 0,04$ nmol/ μ mol POC nach 260 h gemessen werden, was einem Zuwachs von 227 % entsprach. PG zeigte ebenfalls eine Zunahme von $0,03 \pm 0,01$ auf $0,11 \pm 0,01$ nmol/ μ mol POC, was einer Zunahme von 267 % entsprach. Im 2. Laborexperiment schwankte der Gehalt an MDGD zwischen 1 und $0,66$ nmol/ μ mol POC. Der Gehalt von DGDG nahm im Laufe des Experiments von $0,15 \pm 0,05$ auf $0,08 \pm 0,05$ nmol/ μ mol POC ab. SQDG zeigte einen ähnlichen Verlauf wie MGDG. Der Gehalt variierte hier zwischen 0,35 und $0,18$ nmol/ μ mol POC. Ein sichtbarer Trend konnte nicht ausgemacht werden. Der Gehalt von PG blieb relativ konstant bei einem Gehalt von $0,10$ nmol/ μ mol POC. Im Gegensatz zu den ersten beiden Experimenten konnte im 3. Laborxperiment kein Trend in der Entwicklung von MGDG, DGDG und SQDG beobachtet werden. MGDG stellte die größte Lipidgruppe dar, gefolgt von SQDG und DGDG. PG zeigte ebenfalls keinen Trend, der Gehalt lag im gesamten Zeitraum um $0,05 \pm 0,02$ nmol/ μ mol POC. Bei der Kontrolle konnte für MGDG eine Erhöhung von $0,46$ auf $0,57$ nmol/ μ mol POC gemessen werden. DGDG nahm von $0,07$ auf $0,11$ nmol/ μ mol POC und SQDG von $0,16$ auf $0,23$ nmol/ μ mol POC zu. Der Gehalt von PG lag bei $0,04$ nmol/ μ mol POC.

